



10	ES	11	NUMER	448734	12	A3
		21				
		22	FECHA DE PRESENTACION			

PATENTE DE INTRODUCCION

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL
			C07D//A61M
54	TITULO DE LA INVENCIÓN		
	"PROCESO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO 7-AMINO DESACETOXI CEFALOSPORANICO"		
59	PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION		
	PATENTE JAPONESA Nº 46.38143 depositada el 31 de Mayo de 1.971		
71	SOLICITANTE (ES)		
	ANTIBIOTICOS, S.A.		
	DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
	Bravo Murillo, nº 38 MADRID		
72	INVENTOR (ES)		
73	TITULAR (ES)		
	ANTIBIOTICOS, S.A.		
74	REPRESENTANTE		
	DON JAIME ISERN CUYAS, Abogado y Agente Oficial de la Propiedad Industrial.		

**POOR  
QUALITY**

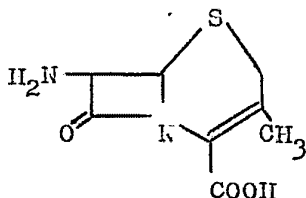
MEMORIA DESCRIPTIVA

5. El objeto de la presente solicitud de Patente de Introducción lo constituye un proceso para la producción de ácido 7-amino desacetoxi cefalosporánico, que aporta esenciales características de novedad sobre lo actualmente conocido y en uso en nuestro país.

EXTRACTO DE LA INVENCION

Acido 7-amino desacetoxi cefalosporánico, representado por la fórmula general

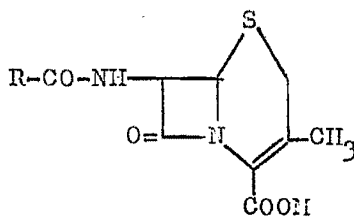
10.



15.

producido de conformidad con un proceso en el cual una sal - del ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico con un metal alcalino representado por la fórmula general:

20.



25.

en la que R es un grupo bencilo o fenoximetilo, y M es un átomo de metal alcalino capaz de formar una sal soluble en agua es tratado con un vehículo que contiene filtrado de cultivo o una cepa productora de enzima perteneciente al género Bacillus, que puede descomponer el enlace amida de dicho compuesto, siendo dicha cepa Bacillus megaterium B-400 FERM P nº 748; o es tratado en un medio acuoso con un preparado de enzima que contiene dicha cepa productora de enzima.

DESCRIPCION

5. PROCESO PARA PRODUCIR ACIDO 7-AMINO DESACETOXI CEFALOSPORANICO (denominado a efectos de la presente "7-ADCA") por medio de la desacilación enzimática de un ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico. De modo más particular, el invento concierne a un proceso para preparar 7-ADCA, es decir ácido 7-amino-3-metil- $\Delta^3$ -cefem-4-carboxílico, con el empleo de un preparado enzimático derivado de Bacillus megaterium.
10. Hasta ahora, el 7-ADCA ha sido producido según un proceso en el que la cefalosporina C se reduce catalíticamente en presencia de paladio-carbono para obtener ácido 3-metil-7-( $\Delta^3$ -amino-adipolilamida)- $\Delta^3$ -cefem-4-carboxílico, que a continuación se desacila por hidrólisis Patente de Los Estados Unidos nº 3.124.576 (1.964) ; un proceso en el que el ácido 7-aminocefalosporánico es desacilado por reducción catalítica (la misma patente de los Estados Unidos que la anteriormente mencionada); y un
15. proceso en el que el 3-metil-7-fenoxi-acetamida- $\Delta^3$ -cefem-4-carboxilato derivado de la fenoximetilpenicilina se trata con  $Cl_2P$  en un disolvente orgánico anhidro en presencia de piridina,
20. y el cloruro de imida resultante se trata con un alcohol para formar un éster de imida, que a continuación se somete a hidrólisis Patentes belgas Núms. 717.741 (1.969) y 737.761 (1.970) .
25. Sin embargo, todos los procesos que se acaban de mencionar son de descomposición química, y no se ha propuesto otro para producir el 7-ADCA enzimáticamente.
30. Teniendo esto en cuenta, los presente inventores realizaron amplios estudios con objeto de producir enzimáticamente el 7-ADCA con ventajas e investigaron varias cepas capaces de desacilar el ácido 3-metil-7-fenoxiacetamido- $\Delta^3$ -cefem-4-carboxílico o el ácido 3-metil-7-fenilacetamido- $\Delta^3$ -cefem-4-carboxílico. Como

- resultado, los inventores han hallado que cepa B-400, perteneciente al género Bacillus, aislada del suelo, produce una enzima capaz de descomponer los enlaces amida del ácido 3-metil-7-fenoxiacetamido- $\Delta^3$ -cefem-4-carboxílico y del ácido 3-metil-7-fenilacetamido- $\Delta^3$ -cefem-4-carboxílico. Los inventores han hallado, además, que cuando se trata el ácido 3-metil-7-fenilacetamido- $\Delta^3$ -cefem-4-carboxílico con un preparado de enzima derivado de la cepa mencionada, se produce un compuesto que es inactivo por sí mismo pero que puede producir 7-ADC. cuantitativamente con la ayuda de fenilacetilcloruro, y que cuando se trata el ácido 3-metil-7-fenoxiacetamido- $\Delta^2$ -cefem-4-carboxílico con el mencionado preparado de enzima, se puede producir también ácido 7-amino-3-metil- $\Delta^2$ -cefem-4-carboxílico.

Las propiedades de la cepa B-400 antes mencionada son las siguientes:

1. Características morfológicas (cultivo en agar-caldo inclinado a 30°C durante 18 a 24 horas):
  1. Células bacilares, principalmente en cadenas largas, con extremidades redondas.
  2. Tamaño: 1,2 a 1,5 por 2,0 a 3,5 micras.
  3. No forman película en el medio de cultivo.
  4. Movible, con flagelos (periferia)
  5. Gram positiva.
  6. Esporas (ágar-soja a 30°C, 5 días)
25. Tamaño: 1,0 a 1,2 por 1,5 a 2,0 micras.  
Forma oval.  
Posición central a para-central.  
Esporangios no claramente delatados.
- II. Comportamiento en diversos medios de cultivo:
  30. I. Siembra en estría en placas de caldo-ágar (30°C, 24 horas)

Buen crecimiento, circular, convexo, no invasor, blanco a amarillo pálido, brillante, blando, húmedo, traslúcido; sin cambio del color del medio.

2.- Tubos inclinados de caldo ágar (30°C, 24 horas):

5. Buen crecimiento, superficie lisa, no invasor, brillante, húmedo. Colonias blanco lechoso, traslúcidas; sin cambio en el color del medio.

3.- Caldo (30°C, 2 días):

10. Buen crecimiento, turbidez uniforme, con sedimento. Sin película.

4.- Siembra por piladura en caldo gelatina (30°C, 20 días).

Crecimiento superficial en el centro, a lo largo de la línea de picador. No liquida la gelatina.

5. Leche tornasolada (30°C, 20 días)

15. No la peptoniza; reduce el tornasol; el medio de cultivo se vuelve marrón amarillento.

6. Slants de agar soja (30°C, 24 horas).

Buen crecimiento color blanco a blanco amarillento, superficie lisa y blanda. Buena formación de esporas.

20. 7. Tubos inclinados de agar-glucosa-nitratos (30°C, 3 días):

Crecimiento escaso.

8. Tubos inclinados de ágar-tirosina (30°C, 3 días):

Buen crecimiento; el medio se vuelve marrón.

9. Patata (30°C, 5 días):

25. Buen crecimiento; colonias rosa a marrón, superficie suave y húmeda, convexa y brillante; el medio se vuelve marrón hacia el tercer día.

### III. Propiedades fisiológicas:

1. Condiciones óptimas de crecimiento:

30. Aeróbico, pH ente 7,0 8,0 y temperatura de 28° a 35°C.

2. Condiciones en que es cultivable:

Aeróbicas, pH entre 5 y 10 y temperaturas de 7° a 45° C.

3. Resistencia a medios ácidos:

Baja, sin crecimiento por debajo de pH 5,0.

5. 4. Conducta ante el oxígeno: °

Aeróbica, sin crecimiento en caldo glucosado bajo condiciones anaerobias.

5. No produce indol.

6. Produce sulfuro de hidrógeno.

10. 7. Reacción de desnitrificación:

Sin formación de gas.

8. Reduce los nitratos.

9.- Formación de catalasa:

Positiva.

15. 10. Formación de ureasa:

Positiva.

11. Hidroliza el almidón.

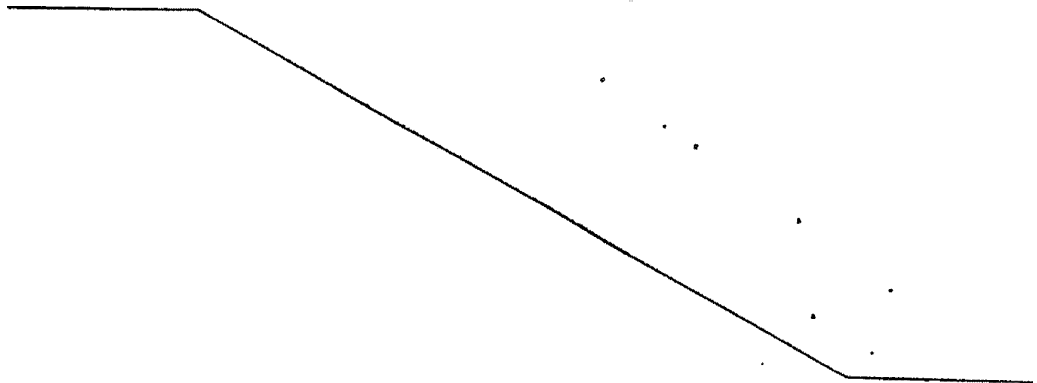
12. Utiliza los citratos (en medios de Koser y Christensen).

13. Reduce el tornasol.

20. 14. Reduce el azul de metileno.

15. Forma pigmento soluble en agua en medio de patata.

IV. Fermentabilidad de los carbohidratos:



	Hidratos de carbono	Formación de ácido	Formación de gas
	Arabinosa	-	-
	Xilosa	-	-
5.	Glucosa	+	-
	Manosa	+	-
	Fructosa	+	-
	Galactosa	-	-
	Ribosa	+	-
10.	Ramnosa	-	-
	Maltosa	+	-
	Sacarosa	-	-
	Lactosa	-	-
	Trealosa	+	-
15.	Rafinosa	-	-
	Celobiosa	+	-
	Sorbitol	-	-
	Manitol	+	-
	Inositol	-	-
20.	Glicerina	+	-
	Glucitol	-	-
	Salicina	-	-
	Inulina	-	-
	Almidón	+	-

25. Cuando se examinó la posición taxonómica de la cepa B-400 que tiene las propiedades micológicas mencionadas, con referencia al Manual de Bacteriología, Determinativa de Bergey, Séptima edición, los presentes inventores identificaron que la cepa pertenecía al género *Bacillus megaterium*. En consonancia, los

30. inventores compararon la cepa B-400 con el cultivo tipo enviado

de la American Type Culture Collection (ATCC) para reconocer que la cepa era similar al *Bacillus megaterium* var. *penicillalyticum* ATCC 14945, pero diferente de ella en los siguientes puntos:

	<i>Bacillus megaterium</i> B-400	<i>Bacillus megaterium</i> var. <i>penicillalyticum</i> ATCC 14945	
5.	Licuefacción de la gelatina	Licuefacción escasa	Licuefacción gradual
10.	Leche tornasolada	Reduce el pigmento	El medio se hace alcalino y el pigmento no se reduce
	Slants de agar patata	Se forma pigmento marrón	No se forma pigmento;
15.		soluble en agua	
	Formación de ácido, de la manosa	Se forma ácido	No se forma ácido

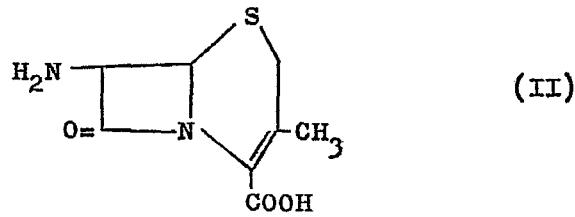
20. Según lo anterior, los inventores reconocieron que la cepa B-400 es nueva, perteneciente al género *Bacillus megaterium*. La cepa B-400 ha sido depositada bajo el número "FERM-P N° 748" en el Instituto de Investigación de la Industrial del Microorganismo, Agencia de Ciencia y Tecnología Industriales, Japón, y también se ha depositado en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio de Investigación Agrícola, División de Utilización, Investigación y Desarrollo del Norte, en Peoria, Illinois, donde se le ha asignado la designación numérica NRRL B-5385.

30. Así, el presente invento es un proceso para la producción del 7-ADCA que consiste en la desacilación de una sal soluble

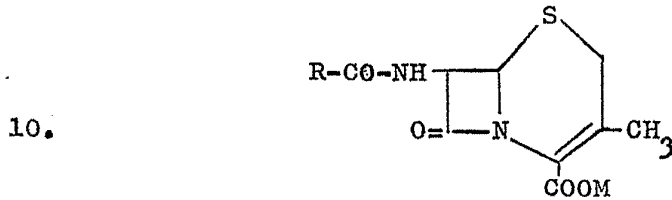
en agua de un ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico - por tratamiento en un medio acuoso con un preparado de enzima derivado del cultivo de una cepa desacilante productora de enzima perteneciente al género Bacillus. Este proceso es de rendimiento alto en 7-ADCA pero no es puede decir que sea comercialmente ventajoso ya que la enzima desacilante tiene que ser separada del cultivo de la cepa desacilante tiene que ser separada del cultivo de la cepa desacilante productora de la enzima; la concentración del 7-ADCA resultante es baja de modo que la separación del 7-ADCA hidrosoluble del líquido de reacción es costosa; y la reutilización de la enzima desacilante es materialmente imposible.

En vista de lo anterior, los presentes inventores hicieron más estudios sobre procesos en los que la enzima desacilante puede reaccionar en fase sólida. Como resultado, los inventores han hallado que cuando un filtrado de cultivo de la cepa desacilante productora de enzima se mezcle con un determinado vehículo, absorbe la enzima sin inactivarla y no la libera bajo una condición tal como el lavado con agua y que cuando se hace fluir una solución acuosa de una sal hidrosoluble del ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico a través de una columna de dicho vehículo, fluye 7-ADCA en una concentración extraordinariamente alta y, además, la enzima descompone continuamente el ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico y de este modo se puede usar con alta eficiencia.

El presente invento ha sido llevado a la práctica sobre la base del citado hallazgo y es un proceso para producir 7-ADCA representado por la fórmula general (II).



5. caracterizado porque una sal de ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico con un metal alcalino denominado a efectos de la presente "Ce(I)" representado por la fórmula general (I)



15. en la que R es un grupo bencilo o fenoximetilo, y M es un átomo de un metal alcalino capaz de formar una sal hidrosoluble, se trata con un filtrado del cultivo de una cepa productora de enzima perteneciente al género Bacillus que puede descomponer el enlace de amida de dicho compuesto Ce(I), o es tratado en un medio acuoso con un preparado de enzima derivado de dicha cepa productora de enzima.

20. El presente invento supone además un proceso para producir el 7-ADCA, caracterizado porque la arriba mencionada enzima desacilante del Ce(I) es adsorbida en un vehículo que no la inactiva, porque se añade una solución acuosa de Ce(I) al mencionado vehículo para desacilar el Ce(I), y porque se recupera 7-ADCA del líquido de reacción.

25. Un objeto del presente invento es aportar un nuevo proceso para producir enzimáticamente un derivado intermedio para la producción de antibioticos del grupo de los que son plenamente útiles como preparados quimioterapéuticos.

30. Otro objeto del invento es aportar un proceso, comercialmente ventajoso, para producir 7-ADCA, en el que la antedicha reacción

enzimática se efectue de manera continua en la fase sólida - adsorbiendo la enzima desacilante en un vehículo, para, de este modo, utilizar repetidamente la enzima sin que sea desactivada."

5. La cepa productora de la enzima desacilante del Ce(I), utilizada en el presente invento es, por ejemplo, el *Bacillus megaterium* B-400 FERM-P N° 748.

10. La enzima capaz de descomponer el enlace de amida del Ce(I) que se utiliza en el presente invento se obtiene cultivando - aeróbicamente el *Bacillus megaterium* B-400 FERM-P N° 748 a 20-37° C, durante 12 a 60 horas en un medio ordinario para el cultivo de bacterias, por ejemplo un medio nutritivo conteniendo cantidades adecuadas de una fuente de nitrógeno tal como peptona, extracto de carne, corn steep liquor, extracto de levadura, levadura seca, hidrolizado de proteína de soja o lixiviado de soja; una fuente de carbono tal como melazas, glucosa ó glicerina; y sales inorgánicas; y, en algunos casos, otros materiales activadores del crecimiento. En general, se efectúa el cultivo en medio líquido con agitación y aireación.

15. La enzima anteriormente mencionada es ordinariamente una exoenzima y está presente en un filtrado de cultivo libre de las células. Por lo tanto, en la reacción la enzima se utiliza en la forma de un filtrado del cultivo o de un preparado de enzima realizado a partir del filtrado del cultivo. El preparado de enzima se obtiene sometiendo a la enzima a un método de purificación conocido. Por ejemplo, se obtiene el filtrado del cultivo concentrado o sin concentrar y se precipitan la enzima por semisaturación o saturación con una sal soluble tal como sulfato amonio o cloruro sodico, o precipitándola por medio de la adición de un disolvente orgánico hidrofílico tal como metanol, etanol o acetona. El precipitado se disuelve en agua, y la solu-

20.

25.

30.

ción resultante se dializa por una membrana semipermeable, con lo cual se pueden eliminar las impurezas de bajo peso molecular. Alternativamente, aprovechando la diferencia en afinidad de adsorción por un agente adsorbente o gel filtrante se pueden

5. separar eficazmente las impurezas de bajo peso molecular, las sustancias coloreadas, las proteínas y los materiales similares que haya en el caldo de cultivo, con arreglo a un procedimiento ordinario tal como la cromatografía de adsorción, la cromatografía de cambio de iones o la filtración por gel. La solución de enzima obtenida según los procedimientos arriba mencionados

10. se puede someter a concentración a presión reducida, liofilizado u operación similar para obtener un preparado enzima tipo standard en forma sólida, o se puede usar tal como es para el tratamiento del Ce(I). En el caso de que el preparado de enzima requiera ser más purificado, se puede adoptar cualquiera de los medios ordinarios para la purificación de proteínas y de

15. enzimas en los que se usa, por ejemplo, un adsorbente, un agente gel filtrante o similar.

Ordinariamente, la reacción de la enzima se lleva a cabo en una forma que el Ce(I) se disuelve en agua o en una solución tampón y a continuación se trata con la antedicha preparación

20. de enzima. El Ce(I) se utiliza en general en forma de sal sódica o potásica hidrosoluble, a una concentración comprendida entre 0,1 y 20 mg./ml, con preferencia de unos 2 a 5 mg/ml. El pH del líquido de reacción se mantiene preferiblemente dentro

25. de la gama de 7 a 8. La temperatura de reacción es de 30° a 45° C, con preferencia de unos 35° a 40° C, con lo que se pueden obtener resultados favorables. El tiempo de reacción varía, dependiendo de las condiciones de la misma, pero ordinariamente se sitúa entre unas 5 y 30 horas, y se puede interrumpir en una

30. etapa adecuada buscando el momento en que el rendimiento con -

7-ADCA representado por la fórmula general (II) es máximo.

- La clase de soporte utilizado en el presente invento varía dependiendo de la clase de cepa productora desacilante del Ce (I) que se utilice. Sin embargo, es necesario elegir el soporte teniendo en cuenta que adsorba la enzima desacilante sin inactivarla, que no libere la enzima aún cuando sea lavado con agua o similar, que no tenga influencia perjudicial sobre la reacción de la enzima desacilante del Ce(I) y que adsorbe con dificultad el 7-ADCA resultante. Por ejemplo, al usar un soporte inorgánico como Celite, terra alba, arcilla activa, caolín, carbón activado o gel de sílice, un cambiador de iones tal como CM-cephadex C-25, o una resina cambiadora de iones como Amberlite CG-50 - Dowex-50, la enzima desacilante del Ce(I) producida por el Bacillus megaterium B-400 es bien adsorbida sin ser inactivada, pero cuando se utiliza alúmina, celulosa en polvo, DEAE-Cellulose, DEAE-Cellulose-25 o una resina cambiadora de anión, la enzima desacilante es escasamente adsorbida o resulta incluso inactivada si ha sido adsorbida.
- Al adsorber la enzima desacilante del Ce(I) en el soporte, es conveniente que el pH del filtrado del cultivo de la cepa productora de la enzima desacilante del Ce(I) se ajuste previamente aun nivel estable para la enzima desacilante. Por ejemplo al adsorber una enzima desacilante producida por el Bacillus megaterium sobre Celite, el pH del filtrado de cultivo de la misma se ajusta en general entre 6 y 8; sin embargo, en particular cuando se usa un cambiador de iones o una resina cambiadora de iones afectados por la potencia iónica, el poder de adsorción o el grado de inactivación de la enzima desacilante tiende a ser influido por el pH, de modo que el vehículo debe ser usado tomando en debida consideración la influencia del pH.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

La operación de adsorber la enzima desacilante en el portador se puede realizar según cualquier procedimiento de batch o de columna. La cantidad del vehículo que se utilice variará dependiendo de la cantidad y título de la enzima en el filtrado de cultivo de la cepa productora de la enzima desacilante y del porcentaje de adsorción de la enzima según el procedimiento de batch, aunque la cantidad usada puede estar entre el 5 y 15 ciento peso/volumen sobre la base de la cantidad de filtrado de cultivo. En el caso de la adsorción en batch, se agita una mezcla del filtrado de cultivo y del portador y, a continuación, este último se separa y se lava con agua, mientras que en el caso de la adsorción por el procedimiento de columna, el vehículo empaquetado en la columna se humedece con agua o con una solución tampón ajustada a pH estable para la enzima desacilante, el filtrado de cultivo se pasa a través de la columna y después esta se lava con agua, con lo que se puede obtener un vehículo que ha adsorbido la enzima desacilante.

Cuando el vehículo así obtenido que ha adsorbido la enzima desacilante se seca, dicha enzima tiende a inactivarse. En consecuencia, es conveniente que el vehículo se use en la siguiente reacción de la enzima desacilante del Ce(I) en estado húmedo sin haberse secado.

El Ce(I) utilizado en el presente invento se puede preparar según un procedimiento conocido, como por ejemplo un proceso en el que el éster del sulfóxido de penicilina se somete a expansión del anillo (Patente de los Estados Unidos Nº 3.275.626), Patente belga Nº 696.026, Patente holandesa Nº 6.801.532 de publicación, Patente belga Nº 745.845, Patente británica Nº 1.204.394, y Patente belga nº 747.118, 747.119 y 747.120), y el éster del ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico re-

sultante se desesterifica, o un procedimiento en el que se desacetoxila un ácido 7-acilamino cefalosporánico (Patente de los Estados Unidos N°3,275,626). Sin embargo, la subsiguiente reacción de la enzima desacilante del Ce(I) se lleva a cabo en un sistema de solución, de modo que el Ce(I) se usa, en general en forma de una sal hidrosoluble de metal alcalino, por ejemplo una sal sódica o potásica.

A continuación, se trata una solución acuosa de Ce(I) con el soporte con la enzima desacilante adsorbida. En este caso, es conveniente que la solución sea tamponada previamente con una solución tampón que tenga el mismo pH que el apropiado de la enzima desacilante. La reacción enzimática mencionada anteriormente se efectúa, en general, según el procedimiento de columna ya por así la reacción se puede efectuar en continuo.

La concentración del Ce(I) que se va a añadir varía principalmente en función del título de la enzima principalmente, es decir, de la capacidad desacilante del Ce(I), de la enzima y del régimen de flujo, aunque es convenientemente ajustada de forma que la cantidad de Ce(I) sin reaccionar que haya de la columna no sea importante. En general, la concentración de Ce(I) es del 0,1 al 2,0 por ciento peso/volumen, con preferencia aproximadamente del 0,5 al 1,0 por ciento peso/volumen, pero no es necesario decir que la concentración varía en función de la clase de soporte utilizado. Desde luego, la reacción arriba mencionada se efectúa a temperatura y pH, adecuados con preferencia a la temperatura y el pH óptimos de la enzima desacilante del Ce(I). Sin embargo, es conveniente que las distintas condiciones de reacción sean elegidas de modo que el 7-ADCA formado en el líquido de reacción fluya en una concentración lo más alta posible. El tiempo de reacción puede ser variado adecua-

- damente aumentando o disminuyendo la cantidad de la solución acuosa de Ce(I) añadida. En general, la reacción termina antes de que haya pasado la solución acuosa de Ce(I) a través de la capa de soporte de la columna. Sin embargo, en el caso de que
5. la proporción de desacilación del Ce(I) hubierasido baja y hubiese quedado una gran cantidad del mismo en el líquido de reacción, éste puede pesarse nuevamente bien por la misma columna o bien a través de una nueva capada con soporte que tenga adsorbida enzima desacilante, con lo cual se puede llegar a obtener
10. un líquido de reacción con un buen rendimiento de desacilación de Ce(I).

- En el caso de que se desee llevar a cabo la reacción enzimática anteriormente mencionada en forma continua, es suficiente que la solución acuosa de Ce(I) sea añadida de manera continua a la capa de soporte con la enzima desacilante adsorbida. Sin embargo, la proporción desacilante del Ce(I) tiende a disminuir gradualmente día a día debido a al crecimiento de flora microbiana. En este caso puede añadirse tolueno en la parte superior de la columna o al sustrato, con lo que se reduce al mínimo el efecto perjudicial debido a la contaminación.
- 15.
- 20.

- En el presente proceso, se puede utilizar un mismo soporte durante más de diez días, de modo que el 7-ADCA se puede recuperar con alto rendimiento y producir a bajo costo. En consecuencia, se puede decir que el presente proceso es extraordinariamente ventajoso para producir 7-ADCA por desacilación enzimática del Ce(I).
- 25.

- La recuperación del 7-ADCA del líquido de reacción así obtenido se puede llevar a cabo según un procedimiento conocido. Por ejemplo, el líquido de reacción se ajusta a un pH de aproximadamente 2 y se lava con un disolvente orgánico hidrofóbico tal
- 30.

- como acetato de etilo, acetato de butilo o metil isobutil cetona, para eliminar el Ce(I) sin reaccionar, y a continuación la capa acuosa se concentra y se ajusta, con enfriamiento, a un pH de 3,7 aproximadamente para precipitar el 7-ADCA isoelectrícamente. También puede adaptarse otra técnica, en ella el líquido de reacción se ajusta a un pH de aproximadamente 3,7, se concentra y después se enfría, y el precipitado resultante se lava con acetona para eliminar el Ce(I) sin reaccionar y el ácido carboxílico que aparece como sus producto de la reacción. -
- 5.
10. De esta forma puede ser recuperado el 7-ADCA. Método para medir la actividad de la enzima adsorbida:

- Se pesa el soporte que ha adsorbido la enzima desacilante, en un tubo de ensayo en forma de L. Se añaden al tubo de ensayo 4,5 ml. de una solución tampón de fosfato 0,1 M (pH 7,5), y se agita durante 10 minutos en un agitador termostatzado de tipo Monod, regulado a 37°C. A continuación, se añade 0,5 ml (10 mg/ml expresados en ácido libre) de una solución acuosa de sal sodica del ácido 7-fenil-acetamida desacetoxi cefalosporá nico, y se hace reaccionar a la mezcla resultante durante 30 minutos. Después de la reacción, el líquido de reacción se enfría inmediatamente y se determina el 7-ADCA del líquido de reacción liberado del soporte, según el método TNBS.
- 15.
- 20.

Se estima que un enzima que forma 100 /ml de 7-ADCA tiene un título de 100 unidades (U).

25. MÉTODOS PARA LA DETERMINACION DEL 7-ADCA.

1.- Método de determinación 1:

- El líquido de reacción se somete a ensayo microbiológico (37°C, 16 horas) según el método del disco de papel o de cilindros utilizando Bacillus subtilis PC1-219 como cepa de ensayo, y se mide el diámetro del halo de inhibición de crecimiento. A
- 30.

partir de la curva standard del Ce(I) se calcula la cantidad de Ce(I), y la diferencia en cantidad entre el Ce(I) inicial y el residual expresandose como un porcentaje del Ce(I) inicial. Este porcentaje es la proporción de descomposición del Ce(I) inicial.

5.

### 2. Método de determinación 2.

Se ajusta una cantidad medida de líquido de reacción a pH 2,5 con ácido clorhídrico 1 N, se lava tres veces con la mitad de su volumen de acetato de butilo, y a continuación se ajusta a pH 7,5 usando una solución acuosa de hidróxido sodico 1 N. A continuación se trata una cantidad medida del líquido de reacción así tratado con un cloruro del ácido correspondiente al ácido presente en la cadena lateral del Ce(I) inicial, y a continuación se somete al encargo microbiológico indicado en el método de determinación 1.- Partiendo de la cantidad del Ce(I) resultante, se calcula la cantidad de 7-ADCA, que se expresa como un porcentaje. Este porcentaje es el rendimiento de 7-ADCA.

10.

15.

### 3.-Método de determinación 3. Método TNBS:

A 1 ml. de una muestra se añaden 2 ml. de una solución - tampón de fosfatos 0,3 M (pH 8,0) y 2 ml. de una solución TNBS al 0,1 por ciento, y la mezcla resultante se hace reaccionar en la oscuridad a 50°C durante 90 minutos. Después de enfriar se añade al líquido de reacción 1 ml. de ácido clorhídrico 6 N y se mide su absorbencia a 395 mμ y se calcula la cantidad de 7-ADCA partiendo de su curva standard.

20.

25.

El presente proceso se ilustra con detalle más adelante con referencia a ejemplos, pero las cepas, las condiciones de reacción y las operaciones de reacción no se limitan a las indicadas en los ejemplos, sino que se pueden variar adecuadamente.

### EJEMPLO I

30.

Preparación del preparado de enzima:

- Se introdujeron 20 litros de un medio de cultivo líquido (pH 7,0) que contenía el 1 por ciento de peptona, el 1 por ciento de extracto de levadura y el 0,5 por ciento de cloruro sodio en un fermentador de 30 litros con agitación, y se esterilizó durante 20 minutos con vapor a 120° C. Después, se siembra bajo condiciones estériles antedicho medio de cultivo con 200 ml. de un caldo de cultivo de *Bacillus megaterium* B-400 FERM-P N° 748 que se había cultivado a 30° C durante 24 horas en un medio de cultivo de la misma composición que la mencionada, y se fermentó a 30° C durante 48 horas con aireación de 20 litros/minuto de 300 r.p.m. Después de la fermentación, las células fueron separadas por medio de un separador centrífugo Westfalia, para obtener 17,4 litros de filtrado de cultivo.

#### EJEMPLO 2

- Se concentró el filtrado del cultivo obtenido en el Ejemplo 1 a 1/3, a una temperatura externa de 30° a 35° C, y el concentrado se cargó con sulfato amonico hasta que se alcanzó el 80 por ciento de la concentración de saturación. El precipitado depositado se disolvió en agua destilada y se desaló por medio de una columna de sephadex G-25, y la solución desalada fue liofilizada para obtener 24,3 gr. de un producto standard de enzima.

#### EJEMPLO 3

Preparación del preparado de enzima:

- Se introdujeron 20 litros de un medio de cultivo líquido (pH 7,0) que contenía el 0,5 por ciento de glucosa, el 0,3 por ciento de glicerina, el 1,0 por ciento de extracto de carne y el 1,0 por ciento de peptona, en un fermentador de 30 litros con agitación y se esterilizó durante 20 minutos con vapor a 120° C. Después, se transfirieron 200 ml. de un cultivo de *Bacillus megaterium* B-400 FERM-P N° 748 que se había cultivado a 30°C durante

24 horas en un medio de cultivo igual que el anterior, haciéndose se la siembra al antedicho medio de cultivo bajo condiciones estériles, y se fermentó a 30° C durante 72 horas con aireación de 20 litros por minuto y agitación de 300 r.p.m. Después de la fermentación, las células fueron retiradas por medio de un separador centrífugo Westfalia, y el filtrado se concentró a 1/3 con una temperatura externa de 30° a 35° C. El concentrado se cargó con acetona hasta que su concentración fue del 60 por ciento, el precipitado depositado se recuperó por filtración y a continuación se secó para obtener 25,5 gr. de un producto standard de enzima.

#### EJEMPLO 4

Se ajustaron 10 litros del filtrado de cultivo de *Bacillus megaterium* B-400 FERM-P N° 748, obtenidos en el Ejemplo 2, a un pH de aproximadamente 7, por medio del uso de ácido acético. Se añadieron al cultivo del filtrado 500 gr. de tierra de diatomeas, y la mezcla resultante se agitó durante 30 minutos. Durante este tiempo, el pH se mantuvo siempre a 7. A continuación el líquido de reacción fue centrifugado por medio de un separador centrífugo de tipo de cesta y después se lavó con agua para obtener 750 gr. de Celite húmeda (título de la enzima, 1.200 U/gr.).

El filtrado del cultivo de *Bacillus megaterium* B-400 FERM-P N° 748 obtenido en el Ejemplo 2 se ajustó a un pH de aproximadamente 7. A cada litro del filtrado de cultivo se añadieron individualmente 50 gr. de cada uno de los siguientes productos: Celite (Hyflo Super Cel), carbón activado (producido por Wako Junyaku Co; para cromatografía), CM-Cellulose de cambio de iones (producida por Serva Co.; 0,52 mcg/gr), y Amberlite CG-50 (forma H) y la mezcla resultante fue agitada durante 30 minutos. Du-

rante este tiempo, el pH se mantuvo siempre a 7 aproximadamente. Después, cada vehículo fue recuperado por filtración y después lavado con agua para obtener un vehículo húmedo. La proporción de adsorción de enzima de cada vehículo fue calculada tomando como el 100 por ciento la proporción de adsorción de la Celite. -

5.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Vehículo	Adsorción relativa
	Proporción (%)
Celite	100
10. Carbón activado	100
Celulosa CM	100
Amberlita CG-50	81,2

EJEMPLO 6

15.

La Celite con la enzima desacilante adsorbida (título de la enzima, 1.800 U/gr.) obtenida en el Ejemplo 8 se tamponó lavando con una solución tampón de fosfato 0,01 M (pH 7,5), se cargó en una columna equipada con camisa (5 x 50 cm.), y después se lavó durante 1 hora a un regimen de flujo definido (velocidad espacial = 0,5) con la misma solución tampón anteriormente mencionada.

20.

La temperatura externa de la columna se regulo haciendo fluir por la camisa agua caliente a 37° C. Después se hicieron fluir 6 litros (5 mg/ml expresados en ácido libre) de una solución acuosa de 7-fenilacetamido desacetoxi cefalosporánato a través de la columna, a un regimen de flujo constante (velocidad espacial = 0,5) y el líquido efluente fue fraccionado en fracciones individuales (volumen de la fracción, 10,8 ml.). Se necesitó un tiempo de unas 16 horas para que terminase de fluir.

25.

30.

Se ajustaron a pH 6,4 6,4 litros del líquido total efluído y

después se concentraron a 1/10. El concentrado se ajustó a pH 3,7 con ácido clorhídrico 6 N, con lo que el 7-ADCA formado empezó a precipitar. Este concentrado se enfrió con hielo para terminar la precipitación, y el redimiento se recuperó por filtración, se lavó con una pequeña cantidad de agua de hielo, se secó lo suficiente con acetona y a continuación se secó para obtener 14,0 gr. de 7-ADCA blanco, punto de fusión 240°-242° C, rendimiento 72,4 %. Este producto se disolvió en una solución acuosa de hidróxido sodico 2,5 N, y la solución resultante fue decolorada con carbón activado, ajustada a pH 3,7 con ácido clorhídrico 6N y después enfriada con hielo para precipitar el 7-ADCA. A continuación el 7-ADCA fue recuperado por filtración, se lavó con acetona y después se secó, con lo que se obtuvieron 11,4 gr. de un producto purificado.

15.

#### EJEMPLO 7

Se repitió el Ejemplo 6, con la excepción de que se usó 4 los preparados con enzima adsorbida CM-Cellulose y Amberlite CG-50 obtenidos en el Ejemplo 5, 3 en lugar de la Celite con la enzima adsorbida 1 para preparar el 7-ADCA. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

20.

Clase de vehículo	Cantidad obtenida (gr.)	Rendimiento (%)
Carbón activado	37,5	58,2
CM-Cellulose	32,9	51,8
Amberlite CG-50	31,3	48,5

25.

#### EJEMPLO 8

Se efectuó el mismo cultivo que en el Ejemplo 1 para obtener un caldo. Se transfirió 1 litro de este a un tanque de 250 litros que contenía 200 litros de un medio de la misma composición que en el Ejemplo 1, y se cultivó a 30° C durante 48 horas. Se utili-

30.

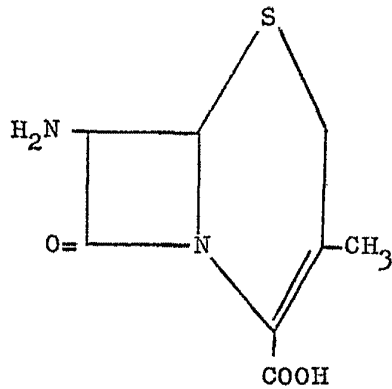
- zaron dos de dichos tanques de 250 litros, para obtener 350 litros de un caldo filtrado. Se añadieron al filtrado 3,5 Kg. de Celite, y la mezcla resultante fue agitada durante 30 minutos, mientras que se mantenía a pH 7. A continuación la mezcla fue
5. centrifugada y el residuo se lavó con agua para obtener 5,2 Kg. de Celite húmeda (título de la enzima, 5.000 U/gr.). Esta Celite se envasó en una columna de cloruro de vinilo de 120 x 900 mm., y se hizo fluir a través de la columna una solución de 5 -
10. mg./ml. de ácido 7-fenilacetamido-desacetoxi cefalosporánico en un tampón de fosfato 0,05 M (pH 7,5), mientras se mantenía la temperatura a 37° C. (Cantidad total, 1,8 Kg/360 litros; régimen de flujo, 5 litros/hora). La elución se terminó en 72 horas para obtener un total de 375 litros de un eluato. A este eluato se le añadieron 290 litros de acetona, y la mezcla resultante
15. se ajustó a pH 4,0 con ácido clorhídrico 6 N, se agitó suficientemente durante 30 minutos y después se dejó en reposo durante la noche para que se depositase un precipitado. El precipitado se recuperó por filtración, se lavó con acetona y después se secó para obtener 1.130,2 gr. de cristales de 7-ADCA (pureza 90,0 por
20. ciento), rendimiento 89,2 por ciento.

N O T A

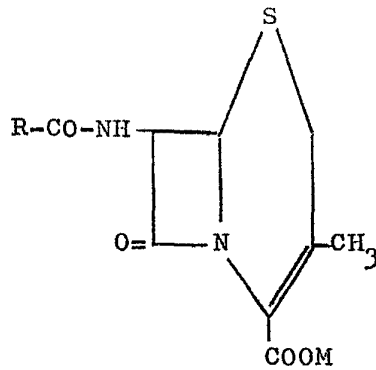
Hecha la descripción del presente invento lo que se declara como no ejecutado ni practicado en España comprende las reivindicaciones siguientes:

25. 1.- Proceso para la producción de ácido 7-amino-desacetoxi cefalosporánico representado por la fórmula general:

*mg*



5. que consiste en tratar una solución acuosa de una sal de un ácido 7-acilamino desacetoxi cefalosporánico con un metal alcalino representado por la fórmula general:



10.

donde R es un grupo bencilo o fenoximetilo, y M es un átomo de metal alcalino capaz de formar una sal soluble en agua, con una enzima desacilante de *Bacillus megaterium* B-400 FERM-P Nº 748

15.

adsorbida en un vehículo para permitir la desacilación del ácido tratado, y la recuperación del ácido 7-amino desacetoxi cefalosporánico del líquido de reacción resultante; siendo dicho vehículo uno que no inactiva a dicha enzima, que no libera la enzima cuando se lava con agua, y que adsorbe difícilmente el ácido

20.

7-amino desacetoxi cefalosporánico resultante.

2.- Proceso de conformidad con la reivindicación 1, en el que dicha enzima desacilante es adsorbida en dicho vehículo de un filtrado de cultivo.

MGE

5. 3.- Proceso de conformidad con la reivindicación 1, en el que dicho ácido 7-amino desacetoxi cefalosporánico está en forma de sal sódica o potásica hidrosoluble en una concentración dentro de los límites de 0,1 a 20 mg/ml y la sal es tratada a un pH dentro de los límites de 7 a 8 a una temperatura de reacción de 30° a 45° C durante un período de unas 5 a 30 horas.

10. 4.- Proceso de conformidad con la reivindicación 1, en el que dicho vehículo es inorgánico, seleccionado del grupo compuesto por Celite, terra alba, arcilla activa, caolín, carbón activo, gel de sílice y cambiador de cationes.

5.- Proceso para la producción de ácido 7-amino desacetoxi cefalosporánico.

Según se describe y reivindica en la presente Memoria que consta de 25 hojas foliadas y mecanografiadas por una sola cara.

Madrid, a 10 de Junio de 1.976

ANTIBIOTICOS, S.A.

p.a.

JAIMÉ ISERN  
p. p.

Firmado: JOSE L. MORA

ME