



ESPAÑA

10	ES	11	NUMERO	10	A 1
		21	452363		
		22	13.10.76		

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
41898/75	15.10.75	Gran Bretaña

43 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07D;A61K	

64 TITULO DE LA INVENCION
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ACIDO CLAVULANICO Y SUS SALES.

71 SOLICITANTE (ES)
BEECHAM GROUP LIMITED

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Beecham House, Great West Road, Brentford, Middlesex Inglaterra

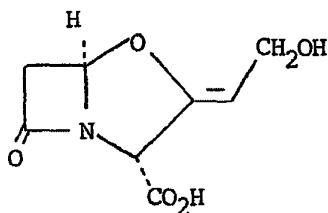
72 INVENTOR (ES)
Stephen John Box, el cual ha cedido sus derechos a la Cía solicitante.

73 TITULAR (ES)
El mismo solicitante

74 REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1 Esta invención se refiere a la producción de ácido
clavulánico y sus sales por fermentación de Streptomyces
jumonjinensis.

5 El ácido clavulánico, que es el útil compuesto anti-
bacteriano de fórmula (I):



10 y sus sales y ésteres están descritos en la patente belga
n° 827.926. En esta patente belga se describe también la
preparación de ácido clavulánico y de sus derivados por fer-
mentación de Streptomyces clavuligerus.

15 El Streptomyces jumonjinensis ha sido descrito en
la patente belga n° 804.341 como productor de un agente
antibacteriano distinto del ácido clavulánico. Ahora se ha
descubierto que durante el cultivo de Streptomyces
jumonjinensis también se produce ácido clavulánico.

20 Por consiguiente, esta invención proporciona un
procedimiento para la preparación de ácido clavulánico y
sus sales que consiste en cultivar una cepa de Streptomyces
jumonjinensis y recuperar ácido clavulánico o una sal del
mismo del cultivo.

25 Adecuadamente el ácido clavulánico se recupera en

1 forma de sal sólida de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio, bario, aluminio, amonio o amonio sustituido. Las sales de amonio sustituido adecuadas son las sales de amonio primario, secundario, terciario y cuaternario.

5 El ácido clavulánico se recupera adecuadamente en forma de sal sólida de metal alcalino, v.g. sal sódica o potásica.

10 Por el término sales sólidas del ácido clavulánico entendemos las sales cristalinas y las sales amorfas de dicho ácido. Convenientemente las sales del ácido clavulánico se obtienen en forma de sales cristalinas, por ejemplo en forma de sal cristalina de tetrahidrato de clavulanato sódico o sales cristalinas de potasio o de litio.

15 Preferiblemente se utiliza en el procedimiento de esta invención Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741 o un mutante de gran rendimiento del mismo.

El Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741 también ha sido depositado en Baarthe Netherlands como CBS 177.76 y en la Colección Alemana de Microorganismos DSN.

20 En el sentido utilizado aquí, el término cultivos significa el crecimiento aerobio deliberado de un organismo productor de ácido clavulánico, en presencia de fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sales minerales. Este crecimiento aerobio puede tener lugar en un medio nutritivo sólido o semisólido o en un medio líquido donde los nutrientes

25

1 están disueltos o suspendidos. El cultivo puede tener lu-
gar sobre una superficie aerobia o mediante cultivo 'sumer-
gido. El medio nutritivo puede estar constituido por nutrien-
tes complejos o puede estar químicamente definido.

5 En la patente belga n° 804.341 se describen las con-
diciones generales para el cultivo de Streptomyces
jumonjinensis.

10 Hemos encontrado medios que contienen nutrientes
complejos como extracto de levadura, harina de soja y simila-
res que son especialmente adecuados.

15 Los medios nutritivos que pueden ser utilizados pa-
ra el cultivo de Streptomyces jumonjinensis pueden contener,
en unas proporciones de 0,1 a 10 %, una fuente compleja de
nitrógeno orgánico como extracto de levadura, licor de infu-
sion de maíz, proteínas vegetales, proteínas de semillas,
hidrolizados de estas proteínas, hidrolizados de proteínas
de leche, extractos de carne y pescado e hidrolizados como
peptonas. Alternativamente pueden utilizarse fuentes de nitró-
geno químicamente definidas como urea, sales amónicas, ami-
20 das, aminoácidos comunes individuales o en mezcla como vali-
na, asparagina, ácido glutámico, prolina y fenilalanina. En
el medio nutritivo pueden utilizarse hidratos de carbono
(0,1-5 %). También pueden utilizarse el almidón o los hidro-
lizados de almidón como dextrina, sacarosa, lactosa u otros
25 azúcares o glicerol y ésteres glicerólicos. Las fuentes de

1 carbono también pueden proceder de aceites vegetales o grasas animales. Pueden incluirse ácidos carboxílicos y sus sales como fuente de carbono para el crecimiento y producción de inhibidores de β -lactamasa.

5 La adición de agentes antiespumantes (como Pluronic L81) puede ser necesaria para controlar la formación de espumas en ciertos medios contenidos en fermentadores.

10 A los medios descritos pueden agregarse sales minerales como NaCl, KCl, MgCl₂, ZnCl₂, FeCl₃, Na₂SO₄, FeSO₄, MgSO₄ y sales de Na⁺ o K⁺ de ácido fosfórico, especialmente si estos medios están químicamente definidos; puede agregarse CaCO₃ como fuente de iones Ca⁺⁺ o por su acción reguladora del pH. También pueden incluirse sales de elementos traza como níquel, cobalto o manganeso. Si se desea pueden agregarse vitaminas.

15 En el sentido utilizado aquí, el término mutante comprende cualquier cepa mutante que surja espontáneamente o gracias al efecto de un agente externo, ya sea aplicado este agente deliberada o involuntariamente. Entre los métodos adecuados de producción de cepas mutantes se encuentran los descritos en la patente belga n° 827.926.

20 El cultivo de Streptomyces jumonjinensis tiene lugar normalmente a una temperatura comprendida entre 16 y 35°C, habitualmente de 20 a 32°C y preferiblemente de 25 a 30°C, 25 por ejemplo alrededor de 27°C y a un pH comprendido entre 5

1 y 8,5 y mejor entre 6 y 7,5.

El Streptomyces jumonjinensis puede ser cultivado en los medios anteriores en vasijas convencionales como erlenmeyers de vidrio aireados por agitación, por ejemplo sacudiendo en un sacudidor rotatorio, o en fermentadores aireados, por ejemplo en fermentadores de acero inoxidable provistos de tabiques, agitados con ruedas de paletas y aireados con un rociador. La fermentación también puede realizarse de forma continua.

10 El pH inicial de la fermentación es 7,0 típicamente y se obtiene un rendimiento máximo de ácido clavulánico en 1-10 días a 20-32°C, por ejemplo en 2-5 días.

El ácido clavulánico y sus sales pueden ser extraídos del filtrado de cultivo por diversos métodos, como los descritos en la patente belga n° 827.926. La extracción con disolvente del filtrado de cultivo frío ajustado a un pH ácido y los métodos basados en la naturaleza aniónica del metabolito, tales como el uso de resinas cambiadoras de anión, han resultado especialmente útiles. Normalmente las células del Streptomyces jumonjinensis se separan primero del caldo de fermentación por filtración o centrifugación antes de iniciar los procesos de extracción citados.

25 En el proceso de extracción con disolvente, se enfría el filtrado del cultivo y se reduce el pH a la región de pH 2-3 mediante la adición de un ácido mientras se

1 mezcla bien con un disolvente orgánico no miscible con agua
como acetato de n-butilo, metilisobutilcetona, n-butanol o
acetato de etilo. El ácido empleado para reducir el pH del
medio es normalmente un ácido mineral como clorhídrico, sul-
5 fúrico, nítrico, fosfórico o similares. El n-butanol es un
disolvente especialmente adecuado para uso en la extracción
del filtrado de cultivo acidulado. Después de separar las
fases por centrifugación, el metabolito ácido clavulánico
es retro-extraído de la fase disolvente a un medio acuoso
10 regulador de bicarbonato sódico o hidrógeno-fosfato potási-
co, una suspensión de CaCO_3 o agua, mientras se mantiene un
pH aproximadamente neutro, por ejemplo pH 7,0. Este extracto
acuoso después de separar las fases puede ser concentrado a
presión reducida y liofilizado para dar un preparado crudo
15 de una sal de ácido clavulánico. Este preparado es estable
cuando se almacena en forma de sólido seco a -20°C .

En el proceso con resina cambiadora de anión, el fil-
trado del cultivo a un pH aproximadamente neutro o ligeramen-
te ácido, por ejemplo a pH 6-7, se pone en contacto con un
20 lecho de resina cambiadora de anion débil o fuertemente bá-
sica, como Amberlite IR4B o Zerolit FFIP, respectivamente,
habitualmente hasta que la resina está saturada y el ácido
clavulánico sale del lecho. Después el lecho se lava con
agua y se eluye con una solución acuosa salina tal como una
25 solución de cloruro de metal alcalino, por ejemplo cloruro

1 sódico. Se recogen las fracciones que contienen ácido clavulánico, se reúnen, se desalifican y se liofilizan para dar una sal sólida cruda de ácido clavulánico. El Amberlite IR4B es un ejemplo de resina cambiadora de anion débilmente
5 básica con grupos poliamínicos activos y una matriz de poliestireno-divinilbenceno reticulada. Otras resinas cambiadoras de anion débilmente básicas adecuadas son el Amberlite IRA68 e IRA93. El Zerolit FFIP es una resina cambiadora de anion fuertemente básica con grupos activos de amonio cuaternario y una matriz de polivinil-divinilbenceno reticulada.
10 Las resinas equivalentes al Zerolit FFIP son el Isopor FFIP y el DeAcidite FFIP SRA 64, 61 y 62.

Otra forma posible del proceso de extracción consiste en poner en contacto el filtrado del cultivo (habitualmente a un pH aproximadamente neutro) conteniendo una sal de
15 ácido clavulánico con una fase orgánica en la que se disuelve una amina insoluble en agua. Los disolventes orgánicos adecuados son disolventes polares convencionales no miscibles con agua como metilisobutilcetona, tricloroetileno y similares.
20 Entre las aminas adecuadas se encuentran las aminas secundarias y terciarias donde uno de los grupos sustituyentes es un grupo alifático de cadena larga, por ejemplo de 12 a 16 átomos de carbono y el otro es un grupo alquilo terciario de manera que la molécula es lipofílica. El Amberlite LA2 ha
25 resultado una amina muy útil. Normalmente la amina se utili-

1 za en forma de sal de adición de ácido. Después de este
proceso de extracción, el ácido clavulánico se encuentra
en la fase orgánica en forma de sal amínica. Después se sepa
ra la fase orgánica del filtrado de cultivo. El ácido cla-
5 vulánico puede ser extraído a una solución acuosa de una
sal de metal alcalino como cloruro sódico, nitrato sódico
o similares. Entonces puede obtenerse la sal cruda de ácido
clavulánico por liofilización o similares.

10 Otros métodos fundamentales de aislamiento que pue-
den ser utilizados son los métodos convencionales como adsor-
ción sobre carbón, precipitación, desplazamiento salino y
filtración molecular. Normalmente estos métodos se utilizan
en combinación con otros métodos de aislamiento.

15 La adsorción sobre carbón puede efectuarse adecuada-
mente haciendo pasar una solución acuosa del filtrado de cul-
tivo a través de un lecho de carbón activo, por ejemplo des-
cendiendo por una columna que contiene carbón. El lecho de
carbón activo se lava después adecuadamente con agua y a
20 continuación se eluye con un disolvente acuoso miscible con
agua, tal como una cetona, por ejemplo acetona y se conservan
las fracciones que contienen el ácido clavulánico. Con frecuen-
cia es conveniente eluir primero con acetona y después con ace-
25 tona acuosa.

 Frecuentemente conviene preparar el ácido clavuláni-
co en forma de sal relativamente insoluble en agua, como la

1 sal de litio. En este caso, la precipitación y el desplaza-
miento salino constituyen métodos útiles de preparación. La
precipitación puede efectuarse convenientemente agregando un
5 disolvente orgánico insoluble en agua a una solución acuosa
de la sal de ácido clavulánico relativamente insoluble en agua,
por ejemplo clavulanato de litio. Este procedimiento puede
ser efectuado adecuadamente poniendo en contacto una sal de
ácido clavulánico con una sal de litio, ya sea por elución
10 de una columna o disolviendo las sales en la misma solución
y agregando el disolvente miscible con agua a la solución
que contiene clavulanato de litio, precipitando así esta sal.

El clavulanato de litio puede ser desplazado salina-
mente de una solución acuosa que contiene clavulanato de litio
en presencia de un compuesto iónico de litio, que es conve-
15 nientemente la sal de litio utilizada para formar el clavulana-
to de litio, aumentando la concentración de iones litio en la
solución de manera que se supere con mucho la solubilidad del
clavulanato de litio a la temperatura de que se trate. Como
el clavulanato de litio es menos soluble a temperaturas más
20 bajas, este proceso se realiza adecuadamente a una temperatura
de por ejemplo 0-5°C.

El sólido crudo obtenido por los medios antes descri-
tos puede purificarse todavía más mediante diversos métodos
pero la cromatografía en columna cambiadora de ion es especial-
25 mente adecuada, en particular cuando se utiliza Isopor, DeAcid

1 FFIP SRA 64 o celulosa DEAE. La columna de DeAcidite puede
ser eluída con gradiente empleando una solución acuosa de
una sal como cloruro sódico (0-0,5M). La columna de celulosa
DEAE en solución reguladora de fosfato 0,01M a pH 7 puede ser
5 eluída con una solución salina, normalmente una solución de
un cloruro metálico alcalino como solución de NaCl (NaCl 0-
0,2M en solución reguladora de fosfato 0,01M a pH 7). Las
fracciones activas pueden ser detectadas por su actividad
inhibitoria de la β -lactamasa y por su actividad sobre el
10 sistema KAG, estando descritas ambas en la patente belga
n° 827.926.

Después se combinan las fracciones que contienen la
mayor parte de esta actividad y se concentran a volumen reduci-
do bajo vacío y se desalifican.

15 La separación del ácido clavulánico y/o de sus sa-
les de las sales inorgánicas en particular pero también de
otras sustancias contaminantes puede conseguirse adsorbiendo
el compuesto antibacteriano en una resina lipofílica en la
que no se adsorben las sales inorgánicas. Ha resultado espe-
20 cialmente adecuado un copolímero de poliestireno-divinilbence
no como Amberlite XAD-4; el antibiótico deseado puede ser se-
parado de la columna por elución (con agua o un alcohol acuo-
so) y la solución resultante puede concentrarse por evapora-
ción y liofilizarse para dar un material de mayor pureza. La
25 separación del ácido clavulánico y/o de sus sales de las sales

1 inorgánicas también puede realizarse adecuadamente por cromatografía en una columna constituida por un agente de filtración de gel, por ejemplo geles de dextrano reticulados como Sephadex G15 y geles de poliacrilamida como Biogel P2.

5 (El Biogel P2, el Sephadex G15 y el Amberlite XAD-4 son suministrados por Bio Rad, Richmond, Estados Unidos, Pharmacia Great Britain Ltd., 75 Uxbridge Road, Londres W.5, Reino Unido y Rohm & Haas, Filadelfia, Estados Unidos, respectivamente).

10 El material desalificado activo puede ser purificado de nuevo por cromatografía, por ejemplo en una columna de celulosa, empleando un sistema disolvente hidroalcohólico, por ejemplo butanol/etanol/agua 4:1:5 en volumen como fase superior.

15 Una variación del procedimiento para la preparación de una forma pura de ácido clavulánico o de sus sales consiste en obtener una forma impura de ácido clavulánico o de una sal del mismo, formar un éster de ácido clavulánico de la forma convencional, purificar el éster y después regenerar
20 el ácido clavulánico o una sal del mismo a partir del éster. Adecuadamente, el éster para uso en este aspecto de la invención es el éster bencílico o un éster hidrogenolizable similar.

25 La forma impura de ácido clavulánico o de sal del mismo que ha de ser purificada mediante este procedimiento puede

1 encontrarse en forma de sólido o de solución que habitual-
mente también contiene cantidades considerables de impure-
zas orgánicas o inorgánicas.

5 El ácido clavulánico o sus sales pueden convertirse
en un éster por reacciones de esterificación descritas ante-
riormente. El método preferido de formación del éster re-
querido del ácido clavulánico es la reacción de una sal de
ácido clavulánico con un agente esterificante tal como un
haluro reactivo, un éster sulfónico o un reactivo equiva-
lente. Estas reacciones se efectúan frecuentemente en un di-
10 solvente orgánico de elevada constante dieléctrica, como di-
metilformamida, dimetilformamida/acetona, dimetilsulfóxido,
N-metilacetamida, hexametilfosforamida y similares.

15 Si se desea, la sal de ácido clavulánico puede di-
solverse en el disolvente de forma convencional o puede combi-
narse a un soporte polimérico. Los soportes adecuados para
uso en este procedimiento son las resinas cambiadoras de anion
fuertemente básicas, especialmente las de carácter macrorreti-
cular que permite el uso de sistemas disolventes no acuosos.
20 Hemos encontrado que es adecuado para este fin el Amberlyst
A 26. La sal de ácido clavulánico puede ser adsorbida en la
resina a partir del filtrado de cultivo y después la resina
se suspende en dimetilformamida que contiene yoduro sódico
y bromuro de bencilo. Alternativamente, el ácido clavuláni-
25 co puede ser eluído de la columna con una solución de yoduro

1 sódico en dimetilformamida o en una mezcla de dimetilforma-
mida y acetona. El ácido clavulánico en el eluato se esterifi-
fica después por adición de bromuro de bencilo.

5 Una vez formado, el éster impuro de ácido clavuláni-
co es normalmente purificado por cromatografía. En muchos
procesos, el éster es disuelto normalmente en un disolvente
orgánico como acetato de etilo, cloruro de metileno, cloro-
formo o disolventes similares. La fase sólida empleada en el
proceso cromatográfico es normalmente un material como gel de
10 sílice o un agente de filtración de gel, como Sephadex LH20
& o materiales cromatográficamente similares.

15 Las fracciones que salen de la columna pueden ser
analizadas para determinar la presencia del éster de ácido cla-
vulánico utilizando sus propiedades sinérgicas o por análisis
químico tal como reacción con cloruro de trifeniltetrazolio en
combinación con cromatografía en capa fina. Normalmente se com-
binan las fracciones activas y se evapora el disolvente orgánico
a presión reducida.

20 El éster resultante de este proceso es generalmente
de una pureza aceptable pero el material puede ser cromatogra-
fiado de nuevo si se desea.

 Este éster purificado de ácido clavulánico puede ser
convertido en el ácido clavulánico o en una sal del mismo por
los métodos descritos en la patente belga n° 827.926.

25 Un medio especialmente adecuado de volver a obtener

1 el ácido clavulánico o sus sales es la hidrogenación de su
éster bencílico. Normalmente estas reacciones tienen lugar
en presencia de un catalizador de un metal de transición,
empleando presiones de hidrógeno bajas o medias. La reacción
5 puede llevarse a cabo a temperatura elevada, ambiente o ba-
ja, por ejemplo a 0-100°C. Unas condiciones de reacción espe-
cialmente adecuadas para esta hidrogenación consisten en una
presión de hidrógeno ligeramente superior a la atmosférica,
aproximadamente a la temperatura ambiente (12-20°C). La reac-
10 ción puede efectuarse en disolventes convencionales como alca-
noles inferiores, por ejemplo etanol. Hemos encontrado que
un catalizador especialmente adecuado es el paladio en carbón.

Si la hidrogenación se lleva a cabo en presencia de
una base, entonces se produce una sal de ácido clavulánico,
15 por ejemplo se obtiene la sal de litio, sodio o potasio si
la reacción se lleva a cabo en presencia de hidrógeno-carbo-
nato sódico o potásico o de carbonato de litio, sodio o po-
tasio.

El ácido clavulánico o sus sales resultantes de es-
20 ta reacción son generalmente de buena pureza, por ejemplo
del 90 % de pureza como mínimo y habitualmente pueden ser
obtenidos prácticamente puros por completo.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la
25 invención.

1

EJEMPLO 1

Se cultiva Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741 durante 7 días a 28°C en cultivos inclinados de agar sólido de la siguiente composición:

5	Extracto de Bacto-levadura (Difco)	4,0 g/l
	Extracto de Bacto-malta (Difco)	10,0 g/l
	Bacto-dextrosa (Difco)	4,0 g/l

Se disuelve en agua destilada

Se ajusta a pH 7,3 y después se añade.

10	Bacto-agar	20,0 g/l
----	------------	----------

El cultivo tomado de este tubo inclinado se utiliza directamente para inocular 100 ml de un medio de siembra contenidos en erlenmeyers de 500 ml con tapones de espuma de plástico. La composición del medio de siembra es la siguiente:

15

	Tryptona (Oxoid)	5,0 g/l
	Extracto de levadura	3,0 g/l

El medio se esteriliza antes de la inoculación calentando en autoclave a 15 psi (1,0 kg/cm²) a 121°C, durante 15 minutos. El cultivo de siembra se incuba a 26°C durante 65 horas en un sacudidor rotatorio a 240 rpm con un recorrido de 1" (25 mm).

20

Se emplean partes alícuotas de 5 ml del medio de siembra para inocular en porciones de 100 ml de un medio de fermentación, contenidas en erlenmeyers de 500 ml tapados con

25

1 tapones de espuma.

Se utilizaron tres medios diferentes de fermentación, cuyas composiciones se dan a continuación:

Medio A

5	Glucosa	20 g/l
	Harina de soja	10 g/l
	CaCO ₃	0,2 g/l
	Na ₂ SO ₄	0,5 g/l
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,001 g/l
10	Completar con agua destilada	

Medio B

	Dextrina	55 g/l
	Harina de soja	20 g/l
	Melazas	20 g/l
15	NaH ₂ PO ₄	1,3 g/l
	KCl	1,0 g/l
	Se completa con agua destilada	

Medio C

20	Extracto de levadura (Oxoid)	10 g/l
	Scotasol	20 g/l
	Se completa con agua destilada y se ajusta el pH a 7 antes de esterilizar.	

25 (La harina de soja es Arkasoy 50, suministrada por la British Arkday Co., Old Trafford, Manchester; Scotasol

1 es la marca de solubles de destilería de malta secos, suministrados por Thomas Borthwick Ltd., 69 Wellington Street, Glasgow, Inglaterra. La dextrina es suministrada por C.P.C. (U.K.) Ltd., Trafford Park, Manchester, Inglaterra).

5 Todos los medios de fermentación fueron esterilizados antes de la inoculación, por tratamiento en autoclave a 15 psi (1,0 kg/cm²) a 121°C, durante 15 minutos.

Los matraces de fermentación se incubaron a 26°C en un sacudidor rotatorio a 240 rpm, con un recorrido de 1" (25 mm). Se tomaron muestras de 5 ml de los matraces de fermentación en condiciones estériles el día 2 de la fermentación y se trataron de la siguiente forma.

15 Se centrifugaron las muestras a 2200 g durante 10 minutos, conservando el líquido sobrenadante. Se encontró que éste poseía actividad inhibitoria contra un preparado de β -lactamasa de E. coli JT4, empleando un ensayo normal de inhibición de β -lactamasa. En la patente belga n° 827.926 se describe un ensayo de inhibición de β -lactamasa adecuado.

EJEMPLO 2

20 Se cultivó Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741 en el Medio A descrito en el Ejemplo 1. Se tomaron muestras de 5 ml a intervalos regulares durante el periodo de fermentación, utilizando una técnica estéril. El líquido sobrenadante obtenido por centrifugación de estas muestras a 2200 g
25 durante 10 minutos fué analizado empleando diversos procedi-

1 mientos detallados a continuación.

(a) Su actividad antibacteriana contra Klebsiella aerogenes A se determinó empleando una depresión en un ensayo de difusión en placa de agar.

5 (b) Se midió su actividad sobre el sistema KAG-placa de agar descrito en la patente belga n° 827.926.

<u>Técnica de análisis</u>	<u>Duración de la fermentación (días)</u>			
	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>7</u>
10 Diámetro de la zona (mm) sobre <u>Klebsiella aerogenes</u>	-	20,5	17,4	-
Diámetro de la zona (mm) en el sistema KAG	-	37,1	26,8	-

15 Se depositaron gotas de muestras del día 4 de esta fermentación sobre tiras de 1 cm de anchura de papel cromatográfico Whatman n° 1. Estas tiras se cromatografiaron durante la noche a 4°C en los siguientes sistemas disolventes:

n-Butanol/etanol/agua 4:1:5 en volumen (fase sup.)

n-Butanol/ácido acético/agua 12:3:5 en volumen.

20 Se secaron las cintas y se depositaron sobre placas de agar sembradas de Klebsiella aerogenes NCTC 418, conteniendo penicilina G (placas KAG). Después de incubar las placas durante 16 horas a 28°C, se observaron zonas de inhibición del crecimiento. En ambos sistemas disolventes se observó una sola zona de inhibición a R_f 0,72 en el sistema butanol/ácido acético/agua y R_f 0,25 en el sistema butanol/etanol/agua.
25 Los valores R_f resultaron iguales a los de una muestra autén-

1 tica de ácido clavulánico analizada en el mismo sistema.

EJEMPLO 3

5 Se cultivó Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741 durante 7 días a 26°C en medios inclinados de agar sólido contenidos en frascos Roux.

El medio de agar era de:

10 Agar extracto de Eacto-levadura-malta (Medio ISP 2) (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, Estados Unidos). Se introdujo en un frasco Roux 100 ml de agua desionizada estéril conteniendo 0,05 % de Triton X (agente tensoactivo) y se rascó la superficie del cultivo para producir una suspensión de esporas y micelio. Se utilizaron 100 ml de la suspensión para inocular 50 litros de un medio de siembra contenidos en un fermentador de acero inoxidable de 90 litros, totalmen-
15 te tabicado.

El medio de siembra tenía la siguiente composición:

	<u>g/l</u>
20 Triptona (Oxoid)	5,0
Extracto de levadura (Oxoid)	3,0
Agente antiespumante	0,5

Completado con agua corriente.

(El agente antiespumante estaba constituido por
10 % de Pluronic L81 (Ugine Kuhlmann Chemicals Ltd) disperse-
25 so en aceite de soja (British Oil & Cake Mills).

El medio fué esterilizado con vapor de agua en el

1 fermentador antes de la inoculación.

Después de la inoculación, el medio de siembra se agitó utilizando un propulsor de discos de 5" (12,7 cm) de diámetro, impulsado a 240 rpm, se inyectó aire estéril a 5 50 litros/minuto y la temperatura se mantuvo a 26°C. El cultivo de la fase de siembra se prosiguió durante 48 horas.

Se emplearon 7,5 litros de la fase de siembra para inocular 150 litros del medio de fermentación contenidos en un fermentador de acero inoxidable de 300 litros, totalmente tabicado. 10

El medio de fermentación tenía la siguiente composición:

	<u>g/l</u>
15 Monohidrato de glucosa	20,0
Harina de soja	10,0
CaCO ₃	0,2
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,001
Na ₂ SO ₄	0,5
Agente antiespumante	0,5

20 Se completa con agua corriente.

(La harina de soja es Arkasoy 50 suministrada por British Arkady Co.Ltd., Old Trafford, Manchester).

El agente espumante fué el mismo utilizado en el medio de siembra.

25 El medio fué esterilizado con vapor de agua en el

1 fermentador antes de la inoculación.

Después de inocular, el medio de fermentación se agitó empleando un propulsor de disco de 8,5" (21,6 cm), impulsado a 340 rpm, se inyectó aire estéril a 150 litros/minuto y la temperatura se mantuvo a 26° durante las 72 horas de fermentación.

El caldo completo se clarificó por centrifugación y el caldo clarificado (140 litros) se ajustó a pH 6,2. El caldo clarificado se pasó por una resina cambiadora de anión fuertemente básica de Zerolit FF (ip) SRA61 (15 x 130 cm) (Zerolit Ltd U.K.) a un caudal de 500 ml/minuto. La columna se lavó con agua desmineralizada enfriada (15 litros) a un caudal de 500 ml/minuto y después se eluyó con una solución acuosa enfriada 1M de NaCl al mismo caudal y se recogieron fracciones de 4 litros. Las fracciones se estudiaron por la técnica habitual de bioanálisis de depresión en placa sobre el sistema KAG-placa. Se combinaron las fracciones (2-19) que daban una buena actividad sobre el sistema KAG. Las fracciones combinadas se ajustaron a pH 6,2 y se enfriaron y pasaron por una columna de Amberlite XAD-4 (30 x 125 cm) (Rohm & Haas, Filadelfia, Estados Unidos) a un caudal de 500 ml/minuto. La columna se lavó con 5 litros de NaCl 1M frío y después se eluyó con agua desmineralizada a 5°C y a 500 ml/minuto. Se recogieron fracciones de 5 litros comenzando inmediatamente antes de completarse la elución del NaCl de la columna. Se combinaron las

1 fracciones (3-9) que contenían ácido clavulánico.

Las fracciones combinadas (35 litros) se concentra-
ron 10 veces por ósmosis invertida (De Danske Sukkerfabrikker
Laboratory Module, membrana tipo 995). La operación consiste
5 en recircular el retentato desde un tanque de acero inoxidable,
provisto de un sistema refrigerante con la válvula de salida
de la unidad de ultrafiltración situada de manera que se obten-
ga una presión diferencial a través de las 40 membranas de
45 atmósferas. La temperatura se mantuvo a 2-5°C y el pH a
10 6,8 ± 0,1 por adición de HCl 2N. El concentrado resultante
(3,5 litros) se secó para dar 34 g de un sólido amorfo pardo.

Se purificaron 2 g de este sólido amorfo por el mé-
todo del Ejemplo 17 de la patente belga n° 827.926 para obte-
ner tetrahidrato de clavulanato sódico cristalino, práctica-
15 mente puro. Se trataron 32 g del sólido amorfo con 10 ml de
bromuro de bencilo y 35 ml de dimetilformamida y la mezcla
se agitó a la temperatura ambiente durante 4 horas. Los di-
solventes se separaron a vacío para dar un residuo semisólido.
Se añadieron 50 ml de acetato de etilo y la materia sólida
20 se separó por filtración. El filtrado se evaporó a vacío pa-
ra dar un aceite.

Se preparó una columna de Sephadex (3,8 x 34 cm)
(Pharmacia Ltd.) en ciclohexano/cloroformo 1:1. Se disolvió
el producto de la bencilación en una cantidad mínima de ciclo-
25 hexano/cloroformo 1:1 y se pasó por la columna que se eluyó

1 con la misma mezcla disolvente. Se despreciaron los prime-
ros 150 ml de eluyente y después se recogieron fracciones
de 25 ml. Se determinó la presencia de clavulanato de benci-
lo colocando unas gotas de muestras de 5 microlitros de cada
5 fracción sobre placas de capa fina de gel de sílice y desarro-
llando las placas en ciclohexano/acetato de etilo 1:1. El cla-
vulanato de bencilo se hizo visible pulverizando con reactivo
de cloruro de trifeniltetrazolio. Se compararon los valores
 R_f con los de una muestra auténtica de clavulanato de benci-
lo cromatografiada en las mismas condiciones (el reactivo de
10 cloruro de trifeniltetrazolio se prepara mezclando una parte
de una solución metanólica al 4 % de cloruro de trifeniltetra-
zolio con una parte de sosa cáustica 1N).

15 Se combinaron las fracciones (30-45) que contenían
el clavulanato de bencilo y se evaporaron a presión reducida
para dar un aceite.

El producto de la columna de Sephadex LH20 se disol-
vió en una cantidad mínima de ciclohexano/acetato de etilo 1:1
y se pasó por una columna de gel de sílice (2,5 x 28 cm)
20 (gel de sílice H de Merck, calidad para cromatografía en ca-
pa fina), preparada en el mismo disolvente. La columna se
eluyó con ciclohexano/acetato de etilo 1:1 y se recogieron
28 fracciones de un volumen de 7 ml, seguidas de fracciones
de 15 ml. Las fracciones (31-33) que daban un color rojo
25 cuando se colocaba una gota sobre placas cromatográficas de

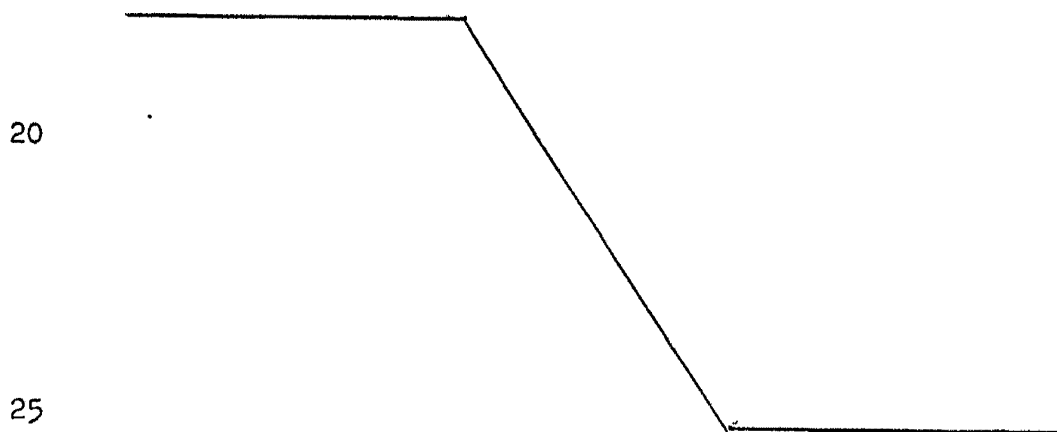
1 gel de sílice en capa fina y se rociaba con reactivo de clo-
ruro de trifeniltetrazolio se combinaron y se evaporaron
a presión reducida.

5 El aceite resultante se sometió a espectroscopía
RMN e IR, siendo los espectros idénticos a los obtenidos con
una muestra auténtica de clavulanato de bencilo.

EJEMPLO 4

Preparación de clavulanato sódico

10 Se hidrogenan 0,5 g de clavulanato de bencilo del
Ejemplo 3 en 20 ml de etanol y 5 ml de agua sobre 0,13 g de
paladio al 10 % en carbón y 0,15g de bicarbonato sódico,
durante 25 minutos, a la temperatura ambiente y a la presión
atmosférica. Se filtra el catalizador, se lava con agua y
etanol y los filtrados combinados se evaporan a vacío. El
15 producto cristaliza en una mezcla de agua y acetona en for-
ma de tetrahidrato de clavulanato sódico.



1 En resumen, la Patente de Invención que se solicita
deberá recaer en las siguientes:

REIVINDICACIONES

5 1.- Un procedimiento para la preparación de ácido
clavulánico y sus sales que consisten en:

- 10 a) cultivar una cepa de Streptomyces jumonjinensis
en un medio nutritivo que contiene fuentes asimilables de carbono y nitrógeno, sales minerales y, opcionalmente, agentes antiespumantes y/o vitaminas, a una temperatura comprendida entre 16 y 35°C y a un pH comprendido entre 5 y 8,5;
- 15 b) separar las células del Streptomyces jumonjinensis del caldo de fermentación por filtración o centrifugación;
- 20 c) extraer el ácido clavulánico y sus sales del filtrado de cultivo;
- d) opcionalmente, desplazar salinamente o precipitar una sal insoluble en agua del ácido clavulánico;
- e) opcionalmente, formar un éster del ácido clavulánico, purificar el éster y después regenerar el ácido clavulánico o una sal del mismo a partir del éster; y
- 25 f) opcionalmente, si se desea purificar todavía más el ácido clavulánico o una de sus sales obtenidas, someterlos a una cromatografía en columna

1 cambiadora de ión.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, según etapa a) consiste en cultivar Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741 o un mutante del mismo de alto rendimiento.

3.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, adaptado a la preparación de las sales sólidas de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio, bario, aluminio, amonio o amonio sustituido.

10 4.- Un procedimiento según la reivindicación 3, adaptado a la preparación de la sal cristalina tetrahidrato de clavulanato sódico o de la sal cristalina de potasio o de litio.

15 5.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde se cultiva una cepa de Streptomyces jumonjinensis y después se separan del caldo de fermentación las células de Streptomyces jumonjinensis y el filtrado de cultivo resultante se extrae para dar ácido clavulánico o una sal del mismo.

20 6.- Un procedimiento según la reivindicación 5, donde el ácido clavulánico o una de sus sales se extrae con disolvente del filtrado del cultivo.

25 7.- Un procedimiento según la reivindicación 6, etapa c) donde el filtrado del cultivo se enfría y el pH del mismo se ajusta a 2-3, después de lo cual el ácido

1 clavulánico que contiene se extrae primero en un disol-
vente orgánico no miscible con agua y después se retro-
extrae en una solución acuosa de bicarbonato sódico, so-
lución reguladora de hidrógeno-fosfato potásico, suspen-
5 sión de carbonato cálcico o agua, manteniendo el pH
aproximadamente neutro y se recupera el ácido clavuláni-
co o una sal del mismo del extracto acuoso resultante.

8.- Un procedimiento según la reivindicación 6,
etapa c), donde el filtrado de cultivo se pone en con-
10 tacto con una fase orgánica en la que está disuelta una
amina insoluble en agua, con lo que el ácido clavuláni-
co es extraído a la fase orgánica en forma de sal de
amina y después se retroextrae el ácido clavulánico a
una solución acuosa de una sal metálica alcalina y se
15 recupera de los extractos acuosos el ácido clavulánico
o una sal del mismo.

9.- Un procedimiento según la reivindicación 5,
donde el ácido clavulánico o una sal del mismo se extrae
del filtrado de cultivo por métodos basados en el caracte-
20 ter aniónico del ácido clavulánico.

10.- Un procedimiento según la reivindicación 9,
etapa c), donde el filtrado de cultivo a pH 6-7 se pone
en contacto con una resina cambiadora de anión, débil o
fuertemente básica, hasta que la resina se satura de áci-
25 do clavulánico y después se eluye con una solución acuo-

1 sa de una sal y se recupera del aluyente una sal de ácido
clavulánico.

5 11.- Un procedimiento según la reivindicación 5,
etapa c), donde se pasa una solución acuosa del filtrado
de cultivo a través de un lecho de carbón activo, después
se lava con agua y se eluye con un disolvente acuoso mis-
cible con agua.

10 12.- Un procedimiento según cualquiera de las rei-
vindicações 5 a 11, que comprende la etapa adicional de
desplazarsalinamente o precipitar una sal insoluble en
agua de ácido clavulánico.

13.- Un procedimiento según la reivindicación 12,
donde la sal insoluble en agua de ácido clavulánico es el
clavulanato de litio.

15 14.- Un procedimiento según cualquiera de las rei-
vindicações 12 ó 13, donde la precipitación se realiza
agregando un disolvente insoluble en agua a una solución
acuosa de la sal relativamente insoluble en agua del áci-
do clavulánico.

20 15.- Un procedimiento según la reivindicación 14,
donde el desplazamiento salino del clavulanato de litio
tiene lugar en una solución acuosa de clavulanato de litio
en presencia de un compuesto ionico de litio, y elevando
la concentración de iones litio en solución de manera que
25 se sobrepase con mucho la solubilidad del clavulanato de

1 litio a la temperatura de la que se trate.

5 16.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 15, que comprende la etapa adicional de formar un éster de ácido clavulánico, purificar el éster y después regenerar el ácido clavulánico o una sal del mismo a partir del éster.

10 17.- Un procedimiento según la reivindicación 16, donde el éster del ácido clavulánico se forma por reacción de una sal de ácido clavulánico con un haluro o un éster sulfónico reactivos.

18.- Un procedimiento según la reivindicación 17, donde el haluro reactivo es el bromuro de bencilo.

15 19.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, donde el ácido clavulánico o una sal del mismo se regenera a partir del éster por hidrogenolisis.

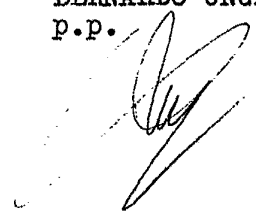
20 20.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 19, que comprende la etapa adicional de purificar todavía más el ácido clavulánico o una de sus sales por cromatografía en columna cambiadora de ión.

25 21.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ACIDO CLAVULANICO Y SUS SALES".

1 Todo conforme queda descrito y reivindicado en
la presente Memoria descriptiva que consta de treinta y
una páginas mecanografiadas.

5

Madrid, 13 de octubre de 1976
BERNARDO UNGRIA
P.P.



10

15

20

25

31