

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que en el presente documento se describen el contenido de la memoria adjunta.

(10) ES

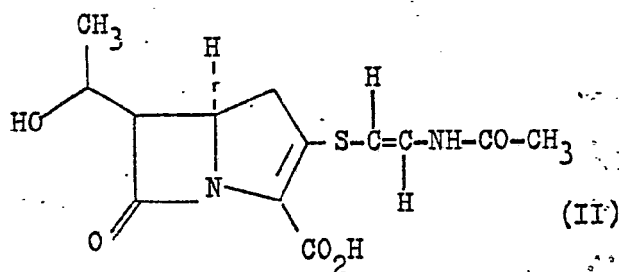
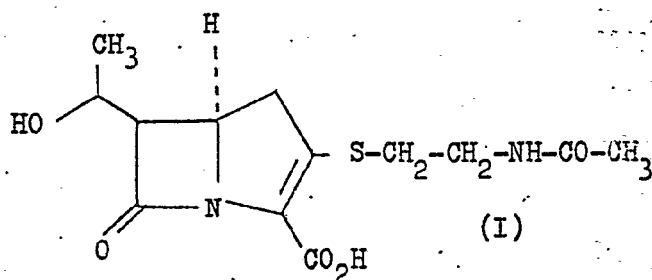
(11) NUMERO	467.562
(22) FECHA DE PRESENTACION	3-MARZO-1978

(10) A1

## PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO 9366/77 32836/77		(32) FECHA 5-3-77 5-8-77	(33) PAIS INGLATERRA INGLATERRA
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C07C // A61K	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA	
(54) TITULO DE LA INVENCION UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS DERIVADOS DE 1-AZABICICLO{3.2.0} HEPT-2-EN-2-CARBOXILICO.			
(71) SOLICITANTE (S) BEECHAM GROUP LIMITED			
DOMICILIO DEL SOLICITANTE Beecham House, Great West Road - Brentford, Middlesex, Gran Bretaña			
(72) INVENTOR (ES) Stephen John Box, de nacionalidad británica.			
(73) TITULAR (ES)			
(74) REPRESENTANTE DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU			

1           Se ha hallado que pueden obtenerse nuevos antibióticos  
 por fermentación de cepas de Streptomyces olivaceus. Estos  
 antibióticos presentan un amplio espectro de actividad y en  
 estado de pureza son inhibidores extraordinariamente potentes  
 5 del crecimiento de muchas bacterias Gram-positivas y Gram-  
 negativas. También pueden aumentar la eficacia de las peni-  
 cilinas y cefalosporinas contra ciertas bacterias producto-  
 ras de  $\beta$ -lactamasa. Estos nuevos antibióticos responden a  
 las fórmulas (I) y (II):



20 Cada uno de los compuestos (I) y (II) puede presentar-  
 se en las formas cis o trans o como mezclas de las mismas.

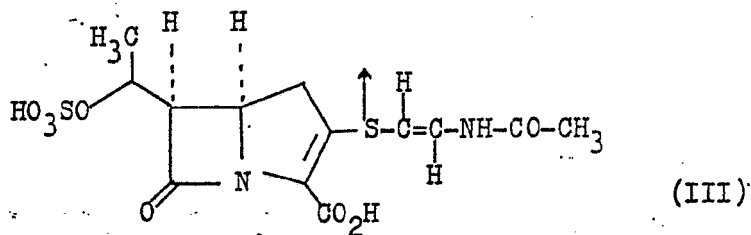
#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25 En las memorias de las patentes británicas 1.467.413,  
 1.489.235 y 1.483.142 se indica que la fermentación de  
Streptomyces olivaceus puede conducir a la preparación de  
 antibióticos denominados MM 4550, MM 13902 y MM 17880 que  
 responden respectivamente a las fórmulas (III), (IV) y (V):

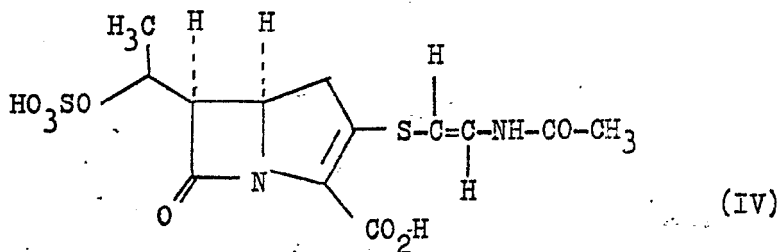
30

1

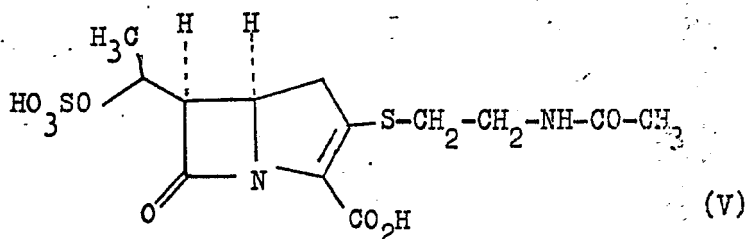
5



10



15



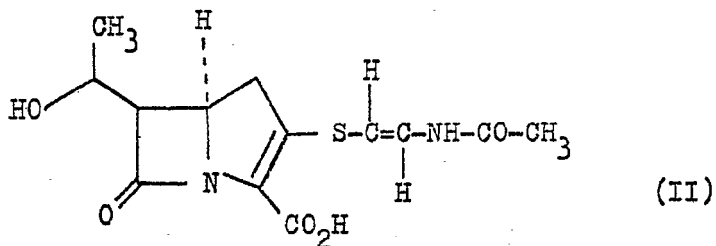
20

Ninguna de estas memorias británicas contenía ninguna sugerencia de que pudiera obtenerse otro antibiótico del caldo de fermentación de Streptomyces olivaceus. Ahora se han encontrado nuevos antibióticos.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

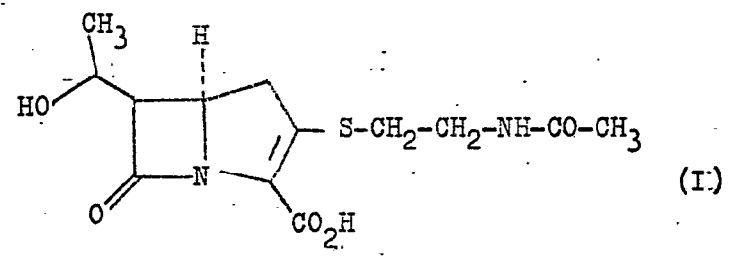
Esta invención proporciona los compuestos de fórmulas (I) y (II):

25



30

1



5

y sus sales.

10

En el caso más adecuado, los compuestos de fórmulas (I) y (II) se encuentran en forma de sal, ya que parece que las sales de los compuestos de fórmulas (I) y (II) son más estables que los ácidos originales.

15

Entre las sales adecuadas de los compuestos de fórmula (I) y (II) se encuentran las de metales alcalinos y alcalino-térreos farmacéuticamente aceptables, como sodio, potasio y calcio y las sales de adición farmacéuticamente aceptables con bases nitrogenadas como las sales de amonio, trimetilamina, dimetilamina, pirrolidina y similares.

20

Son sales especialmente adecuadas de los compuestos de fórmulas (I) y (II) las de sodio y potasio.

Un compuesto preferido de esta invención es la sal sódica de un compuesto de fórmula (I). Un segundo compuesto preferido de esta invención es la sal sódica de un compuesto de fórmula (II).

25

Como los compuestos de fórmulas (I) y (II) y sus sales se destinan al uso en composiciones farmacéuticas, se comprenderá fácilmente que ambos se proporcionan en forma esencialmente pura, por ejemplo de una pureza del 50 % como mínimo, más adecuadamente del 75 % como mínimo, preferiblemente del 90 % como mínimo y todavía mejor del 95 % como mínimo. Los preparados impuros de los compuestos de fórmulas (I) y (II) y sus sales pueden utilizarse para la preparación de formas

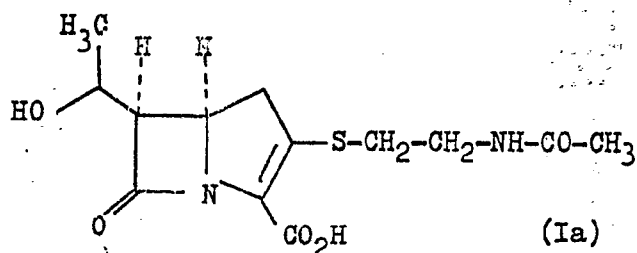
30

1 más puras empleadas en las composiciones farmacéuticas, y  
estos preparados menos puros de los compuestos de fórmulas  
(I) y (II) y sus sales deben contener como mínimo un 1 %, más  
5 adecuadamente como mínimo un 5 % y preferiblemente del  
10 al 49 % de un compuesto de fórmula (I) y (II) o sus sales.  
Los más útiles de estos preparados menos puros comprenden  
una sal del compuesto de fórmula (I) y una sal del compues-  
to de fórmula (II). (Los porcentajes están expresados en  
peso).

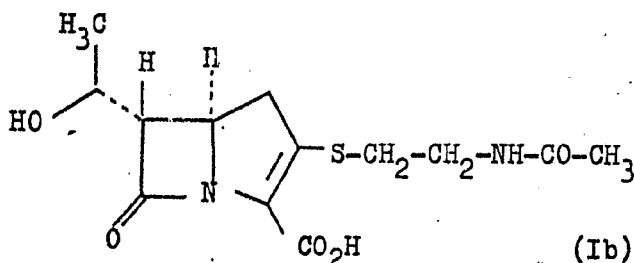
10 En general se prefiere que las sales esencialmente pu-  
ras de los compuestos de fórmula (I) o de fórmula (II) no  
estén contaminadas con cantidades sustanciales de otros agen-  
tes antibacterianos como las sales de los compuestos de fór-  
mula (III), (IV) y (V), obtenidas del caldo de fermentación.

15 Los compuestos de fórmulas (I) y (II) se presentan en  
las formas cis y trans alrededor del anillo de  $\beta$ -lactama. Es-  
tas formas pueden ser representadas por las fórmulas (Ia),  
(Ib), (IIa) y (IIb); así:

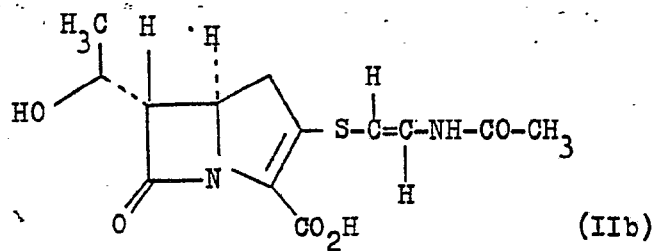
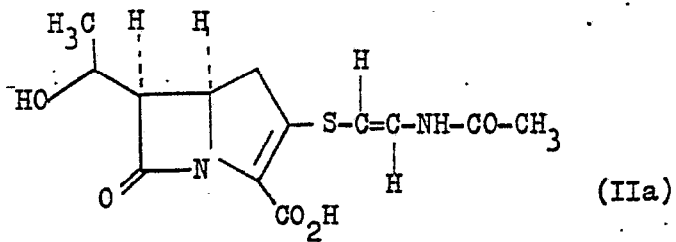
20



25



30



10

Se observará que los compuestos anteriores pueden ser denominados como sigue:

15

Ia ácido (5R,6R)-3-(2-acetamidoetil)io)-6-((S)-1-hidroxi-  
etil)-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-en-2-carboxi-  
fílico

ácido (5R,6S)-3-(2-acetamidoetil)io)-6-((S)-1-hidroxi-  
etil)-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-en-2-carboxi-  
fílico

20

IIb ácido (5R,6R)-3-((E-2-acetamidoetil)io)-6-((S)-1-  
hidroxi)etil)-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-en-2-car-  
boxílico

25

IIb ácido (5R,6S)-3-((E-2-acetamidoetil)io)-6-((S)-1-  
hidroxi)etil)-7-oxo-1-azabicyclo[3.2.0]hept-2-en-2-car-  
boxílico.

30

Ambos isómeros cis y trans de los compuestos de fórmu-  
las (I) y (II) poseen útiles propiedades antibacterianas e  
inhibidoras de la  $\beta$ -lactamasa y, por lo tanto, esta invención  
se extiende a los compuestos aislados de fórmulas (Ia) y (Ib)  
así como a las mezclas de los mismos y a los compuestos aislados

1 dos de fórmulas (IIa) y (IIb) así como a las mezclas de los mismos.

5 Las formas cis y trans aisladas naturalmente deben encontrarse adecuadamente en forma de sales esencialmente puras y farmacéuticamente aceptables como se ha descrito antes; es decir, deben tener una pureza del 50 % como mínimo, más adecuadamente del 75 % como mínimo, preferiblemente del 90 % y todavía mejor del 95 % como mínimo. Además, se prefiere utilizar uno de los compuestos anteriores esencialmente exento de su isómero en la posición 6 (es decir, (Ia) exento de (Ib), (IIa) exento de (IIb), (Ib) exento de (Ia) o (IIb) exento de (Ib)}. En general, estos compuestos no deben contener más del 5 % de su isómero en la posición 6 y preferiblemente no más del 1 % de dicho isómero. (Para determinar las purezas puede utilizarse la cromatografía de líquidos a alta presión).

15 Un aspecto preferido de esta invención proporciona una sal metálica alcalina del compuesto de fórmula (Ia) con un coeficiente de extinción molar (en agua a pH neutro) no inferior a 7700 (preferiblemente no inferior a 7900) (para un máximo de absorción ultravioleta a unos 298 nm).

20 Un aspecto preferido de esta invención proporciona una sal metálica alcalina del compuesto de fórmula (Ib) con un coeficiente de extinción molar (en agua a pH neutro) no inferior a 7700 (preferiblemente no inferior a 7900) (para un máximo de absorción ultravioleta alrededor de 301 nm).

25 Un aspecto preferido de esta invención proporciona una sal metálica alcalina del compuesto de fórmula (IIa), con un coeficiente de extinción molar (en agua a pH neutro) no inferior a 13.000 (preferiblemente no inferior a 13.500) (para

30

1 un máximo de absorción ultravioleta alrededor de 308 nm).

5 Un aspecto preferido de esta invención proporciona una sal metálica alcalina del compuesto de fórmula (IIb) con un coeficiente de extinción molar (en agua a pH neutro) no inferior a 13.000 (preferiblemente no inferior a 13.500) (para un máximo de absorción ultravioleta alrededor de 308 nm).

Preferiblemente las sales metálicas alcalinas anteriores son las sales sódicas.

10 Esta invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o (II) o una sal del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de esta invención utilizarán generalmente una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de fórmula (I) o (II), por ejemplo una sal sódica o potásica.

15 Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden adaptarse a la administración por vía oral o parenteral. Adecuadamente, las composiciones se preparan en forma de dosis unitarias que contienen de 50 a 500 mg de un compuesto de fórmula (I) o (II) o de su sal, por ejemplo alrededor de  
20 100, 150, 200 o 250 mg.

En el caso más habitual, la composición es adecuada para administración por inyección.

25 Estas composiciones pueden contener diluyentes, ligantes, desintegrantes, lubricantes u otros excipientes convencionales y pueden prepararse por métodos convencionales de mezclado, llenado y similares.

Las composiciones pueden adoptar la forma de tabletas, cápsulas, viales u otras formas similares.

30 Si se desea, la composición puede contener ventajosamente una penicilina o una cefalosporina. En estos casos,

1 la relación del compuesto sinérgico (es decir, el compuesto  
de la invención) (preferiblemente en forma de sal) a penicilina o cefalosporina es habitualmente de 2:1 a 1:12 y más  
habitualmente de 1:1 a 1:5, por ejemplo 1:2, 1:3 o 1:4 en  
5 peso.

Entre las penicilinas especialmente adecuadas para su  
inclusión en las composiciones se encuentran la ampicilina,  
amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina y sus prodrogas.  
Cuando se adaptan para inyección, estos compuestos se pre-  
sentan generalmente en forma de sus sales sódicas.

10 Son cefalosporinas especialmente adecuadas para su  
inclusión en las composiciones la cefaloridina y la cefazolina.

15 Las penicilinas preferidas para su inclusión en las  
composiciones son el trihidrato de ampicilina, trihidrato  
de amoxicilina, ampicilina sódica y amoxicilina sódica.

Las cefalosporinas preferidas para su inclusión en  
las composiciones de esta invención son la cefaloridina y  
la cefazolina sódica.

20 El compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal puede ser  
un compuesto aislado de fórmula (Ia), (Ib) o (IIa), (IIb) o  
sus sales o puede ser mezclas de los compuestos de fórmulas  
(Ia) y (Ib) o (IIa) y (IIb) o sus sales. Sin embargo, se  
prefiere emplear un compuesto de una de las fórmulas anterior-  
25 res exento de su isómero. Este compuesto se encuentra gene-  
ralmente en forma de una sal farmacéuticamente aceptable,  
como la sal sódica.

30 Esta invención también proporciona un procedimiento para  
la preparación de un compuesto de fórmula (I) o (II) o su  
sal, cuyo procedimiento consiste en cultivar una cepa de

1 Streptomyces olivaceus o Streptomyces gedanesis productora  
hasta que se ha producido una cantidad sustancial de un com-  
puesto de fórmula (I) o (II) o su sal y después recuperar  
5 un compuesto de fórmula (I) o (II) o su sal del medio de  
cultivo.

En el sentido utilizado aquí, el término "Streptomyces  
olivaceus" se define de acuerdo con la clasificación de  
Hütter, R. (en Systematic der Streptolyceten, S. Korger,  
Basilea, págs. 8-32). Obsérvese que en esta definición,  
10 Streptomyces fulvovoridis, Streptomyces flavus y Streptomyces  
flavovirens pueden considerarse sinónimos de Streptomyces  
olivaceus.

Las cepas adecuadas son las descritas en la memoria  
de la patente británica n° 1.467.413.

15 Un organismo preferido para uso en este procedimiento  
es el Streptomyces olivaceus ATCC 31.126 o un mutante del  
mismo de alto rendimiento.

Otro organismo preferido para uso en este procedimien-  
to es el Streptomyces olivaceus ATCC 31.365 o un mutante del  
20 mismo de alto rendimiento.

Como se ha indicado anteriormente, el material recupe-  
rado debe tener una pureza del 1 % como mínimo, más adecua-  
damente del 5 %, todavía mejor del 50 % como mínimo, prefe-  
riblemente del 75 % como mínimo y más preferiblemente del  
25 90 % como mínimo, por ejemplo 95 % de pureza como mínimo.

En el sentido utilizado aquí, el término "cultivo" sig-  
nifica el crecimiento aerobio deliberado de un organismo en  
presencia de fuentes asimilables de carbono, nitrógeno, azu-  
fre y sales minerales. Este crecimiento aerobio puede tener  
30 lugar en un medio sólido o semisólido pero en general es pre-

1 ferible utilizar un medio líquido. Las condiciones generales  
de cultivo para el crecimiento de Streptomyces olivaceus  
son las descritas en la memoria de la patente británica n°  
5 1.467.413. Las condiciones generales para el crecimiento de  
Streptomyces gedanensis son similares.

El procedimiento de esta invención puede adaptarse a  
la obtención de un compuesto de fórmula (I) o su sal, un  
compuesto de fórmula (II) o su sal o un compuesto de fór-  
mula (I) o su sal, junto con un compuesto de fórmula (II) o  
10 su sal.

Normalmente el procedimiento se adapta a la prepara-  
ción de una sal en lugar de a la preparación del ácido ori-  
ginal.

Es preferible que el medio de cultivo no contenga sul-  
fato añadido ya que éste conduce frecuentemente a la prepa-  
15 ración de MM 4550, MM 13.902 o MM 17.880, a expensas de la  
producción de los compuestos de fórmula (I) y (II) y sus  
sales.

Los compuestos de fórmula (I) y (II) en forma de sus  
20 sales pueden obtenerse a partir del filtrado del cultivo por  
(a) contacto del filtrado con carbón hasta que la actividad  
antibiótica se ha absorbido en este último, (b) elución de la  
actividad antibiótica del carbón empleando acetona acuosa,  
(c) combinación de las fracciones que contienen las fraccio-  
25 nes inhibitoras de la  $\beta$ -lactamasa, (d) evaporación de la  
acetona y gran parte del agua para formar una solución acuo-  
sa más concentrada, (e) aplicación de la solución a una co-  
lumna cambiadora de anión y (f) elución de los metabolitos  
30 inhibidores de la  $\beta$ -lactamasa con una solución de un electro-  
lito tamponada a neutralidad aproximadamente, recogiendo las

1 fracciones que contienen el compuesto de fórmula (I) o (II)  
en forma de sal, (g) aplicación de la solución resultante a  
una resina que separa las materias inorgánicas de los compues-  
tos (I) y (II) y (h) aislamiento del preparado sólido de la sal de  
5 un compuesto de fórmula (I) o (II) de la solución resultante.

Los compuestos de fórmula (I) y (II) en forma de sus sa-  
les también pueden obtenerse del filtrado del cultivo por (1)  
contacto del caldo de cultivo clarificado con una resina cam-  
biadora de anión de base acrílica, fuertemente básica, hasta  
10 que la actividad antibiótica se ha absorbido sobre ella, (2)  
elución de la actividad antibiótica de la resina utilizando  
una solución acuosa de un tampón conteniendo también opcional-  
mente una sal, (3) combinación de las fracciones que poseen  
actividad inhibitoria de la  $\beta$ -lactamasa, (4) aplicación de  
15 las fracciones combinadas a una columna de XAD-4, (5) elución  
con isopropanol acuoso, (6) combinación de las fracciones con  
actividad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa, (7) separación del  
isopropanol y concentración de la solución por evaporación,  
(8) aplicación de la solución a una resina cambiadora de  
20 anión y procesado como en las etapas (f), (g) y (h) señaladas  
anteriormente.

En general se prefiere utilizar una resina cambiadora de  
anión de base acrílica, fuertemente básica (tipo 1) (en forma  
de sal de adición de ácido, normalmente el hidrocloreuro), tal  
25 como Amberlite IRA 458 (que puede obtenerse, por ejemplo de  
Rohm and Haas, v.g. en Lennig House, 2 Massons Avenue, Croydon,  
Reino Unido). Una ventaja de esta resina es que permite eluir  
sucesivamente la sal de los compuestos de fórmula (I) y (II),  
empleando una solución acuosa de una sal, por ejemplo una so-  
lución tamponada de un cloruro como el cloruro sódico o simi-  
30

1 lares. Si se emplean resinas fuertemente básicas con una ma-  
trix de poliestireno/divinilbenceno, que son menos preferi-  
das, generalmente es necesario eluir con una solución acuo-  
5 sa-alcanólica inferior de una sal (por ejemplo un cloruro co-  
mo el cloruro sódico) para obtener recuperaciones satisfac-  
torias y estos disolventes pueden conducir a un preparado me-  
nos puro de los materiales deseados.

(Esta variante del procedimiento difiere del procedi-  
miento de absorción en carbón en que las sales de MM 4550,  
10 MM 13.902 y MM 17.880 se separan de las sales de los com-  
puestos de fórmula (I) y (II) en la primera fase de elución)

El procedimiento de esta invención difiere fundamen-  
talmente del procedimiento previamente descrito en que las frac-  
ciones seleccionadas para su posterior procesado en la etapa  
15 (I) son las que contienen la sal de un compuesto de fórmula  
(I) y (II) esencialmente exento de otros antibióticos.

Los ácidos libres de fórmulas (I) y (II) pueden obte-  
nerse por acidulación cuidadosa de una sal del compuesto de  
fórmula (I) o (II) respectivamente, seguida de rápida extrac-  
20 ción en un disolvente orgánico no miscible con agua y segui-  
do de recuperación del ácido de la solución.

En los procedimientos de esta invención, frecuentemen-  
te es muy conveniente trabajar con una sal metálica alcalina  
del compuesto de fórmulas (I) y/o (II), como las sales de li-  
25 tio, sodio o potasio y entre éstas se prefiere la sal sódica.  
Es posible preparar otras sales por el proceso de extracción  
pero habitualmente es más adecuado formar primero la sal me-  
tálica alcalina purificada, especialmente la sal sódica y  
después convertir esta última en otra sal, por ejemplo ha-  
30 ciéndola pasar a través de un lecho de resina cambiadora de

1 catión en forma de la sal alternativa. Así, en esta descrip-  
ción, pueden emplearse otros electrolitos (como las sales  
de litio, potasio u otras) en lugar de las sales sódicas des-  
critas pero en general se prefiere trabajar con la sal só-  
5 dica. Análogamente, pueden emplearse sales diferentes de los  
cloruros (por ejemplo bromuros, nitratos o similares), aunque  
en general se prefiere trabajar con un cloruro.

10 Un método preferido de purificación cromatográfica  
(etapas f y g) utiliza una solución acuosa con una sal sódica  
tamponada a neutralidad aproximadamente, en combinación con  
una resina básica cambiadora de ion. Así, puede utilizarse  
una solución acuosa de cloruro sódico (u otra sal similar)  
tamponada a pH aproximadamente 7 con un tampón convencional,  
15 como tampón de fosfato, en combinación con resinas de soporte  
que contienen grupos amino secundarios o terciarios o gru-  
pos amino cuaternarios. Los soportes adecuados son las celu-  
losas básicas cambiadoras de ion y los dextranos reticula-  
dos básicos cambiadores de ion como la celulosa DEAE, DEAE-  
Sephadex, QAE-Sephadex y agentes equivalentes.

20 Un método adecuado similar de purificación cromatográfica  
(etapas f y g) utiliza un sistema disolvente constituí-  
do por una mezcla de agua y pequeñas cantidades de un disol-  
vente orgánico no miscible con agua, tal como un alcohol infe-  
rior (es decir, un alcohol  $C_{1-4}$ ), en combinación con un ma-  
25 terial inerte de soporte como gel de sílice o celulosa. Los  
sistemas disolventes adecuados son isopropanol acuoso, n-bu-  
tanol acuoso y similares. Por ejemplo, puede utilizarse una  
mezcla aproximadamente 1:4 de agua e isopropanol en combina-  
ción con el soporte de celulosa.

30 El producto del procedimiento anterior frecuentemente

1 contiene una gran proporción de cloruro sódico de manera que  
es beneficioso desalificar las soluciones reunidas. La desa-  
lificación puede realizarse pasando la solución a través de  
5 un lecho de material lipófilo sobre el cual es adsorbido el  
antibiótico pero que no adsorbe el cloruro sódico. Los mate-  
riales adecuados son los absorbentes poliméricos a base de  
poliestireno como Amberlite XAD-4, Diaion HP20 y similares.  
El producto del procedimiento anterior también puede ser  
desalificado por cromatografía en agentes de filtración de  
10 gel adecuados, como dextranos reticulados como Sephadex G10  
y G15 y geles de poliacrilamida como Biogel P2. El antibió-  
tico puede ser eluido de estos materiales utilizando agua,  
metanol acuoso o similares.

15 Las columnas se eluyen a una velocidad que permita la  
separación de los antibióticos en fracciones definidas. En  
general, pueden eluirse de estas columnas zonas definidas;  
estas contienen MM 4550 disódico, MM 13.902 disódico, MM17880  
disódico, las sales sódicas de los compuestos de fórmula (I)  
y las sales sódicas de los compuestos de fórmula (II) que  
20 eluyen próximas a las sales sódicas de los compuestos de  
fórmula (I). En general, las tres sales disódicas están bas-  
tante separadas de las sales monosódicas en las resinas cam-  
biadoras de anión. Si la columna no se controla cuidadosamen-  
te, puede ocurrir que se obtengan las sales monosódicas en  
25 fracciones superpuestas. Si así ocurre, entonces caben las  
dos acciones siguientes: (a) liofilizar esta solución para  
formar un complejo impuro útil que contiene los antibióti-  
cos que pueden ser reprocesados más adelante o (b) recroma-  
tografiar la solución tal como está con control cuidadoso  
30 del eluyente para garantizar la recogida de la solución de

1 sal sódica de un compuesto de fórmula (I) exenta de la sal  
sódica de un compuesto de fórmula (II) y/o la recogida de  
la solución de la sal sódica de un compuesto de fórmula (II)  
5 exenta de la sal sódica de un compuesto de fórmula (I); es-  
tas soluciones pueden ser después liofilizadas o liberadas  
del disolvente en cualquier otra forma.

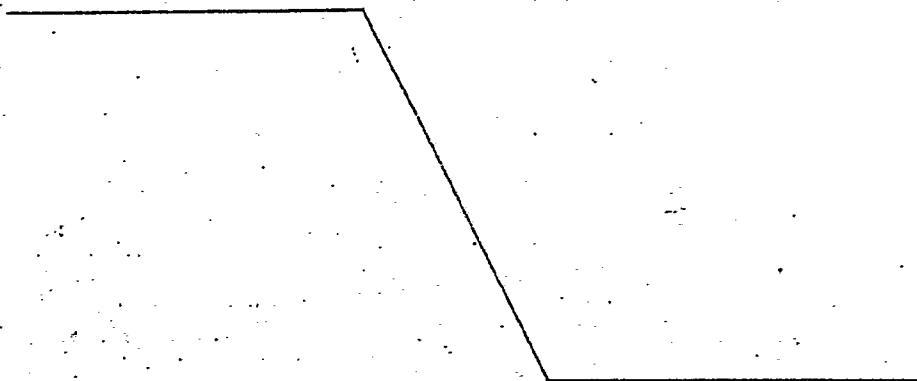
Las fracciones elegidas para recogerlas serán aquéllas  
que presenten una actividad significativa inhibidora de la  
 $\beta$ -lactamasa o antibacteriana. Los métodos adecuados de de-  
10 tección de la actividad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa inclu-  
yen los de las patentes británicas antes mencionadas, aunque  
puede emplearse cualquier método conveniente.

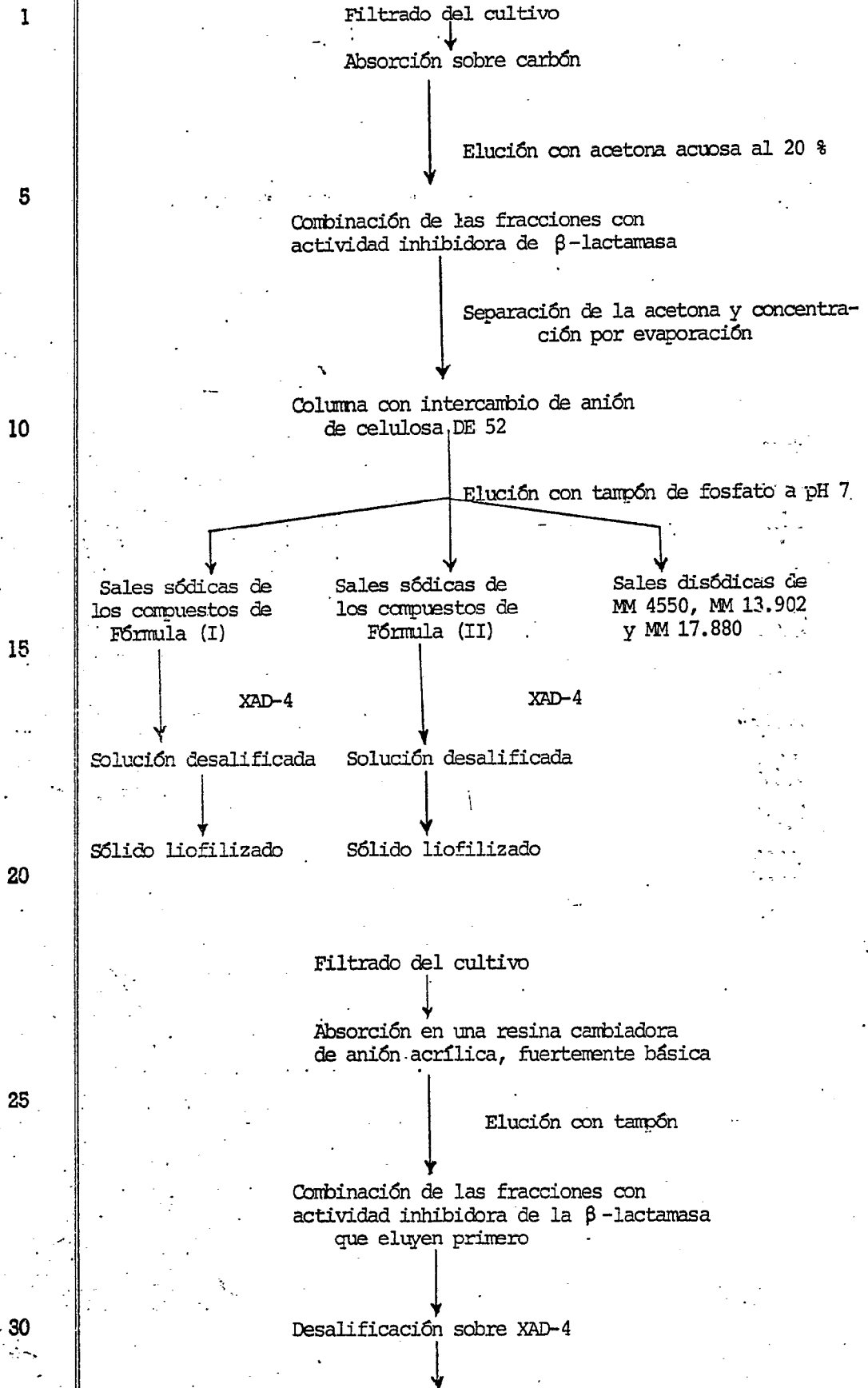
El siguiente esquema muestra la secuencia preferida de  
obtención de los compuestos de fórmulas (I) y (II) en forma  
15 de sus sales sódicas. Las sales sódicas obtenidas de esta  
forma pueden ser purificadas de nuevo si se desea, utilizan-  
do los procedimientos cromatográficos anteriormente descritos.

Por trituración de las sales de los compuestos de fór-  
mulas (I) y (II) debajo de un disolvente orgánico, tal como  
20 acetonitrilo o acetona húmedos, puede favorecerse la separa-  
ción de las impurezas.

25

30





1

Elución con isopropanol acuoso

5

Combinación de las fracciones  
con actividad inhibidora de  
 $\beta$ -lactamasa

Separación del isopropanol y concen-  
tración por evaporación

10

Resina cambiadora de anión  
celulosa DE 52

Elución con tampón de fosfato a pH 7

Sales sódicas de los  
compuestos de Fórmula (I)

Sales sódicas de compues-  
tos de Fórmula (II)

15

XAD-4

YAD-4

Solución desalificada

Solución desalificada

Sólido liofilizado

Sólido liofilizado.

20

Si se desea, las sales de los compuestos de fórmula (I) y (II) preparadas por los métodos anteriores pueden ser sometidas de nuevo a técnicas de separación cromatográfica para dar una sal aislada de un compuesto de fórmula (Ia), (Ib), (IIa) o (IIb). Estos procedimientos constituyen aspectos preferidos de esta invención. Normalmente, la sal utilizada en dicho procedimiento será una sal monovalente como la sal amónica o una sal metálica alcalina como la sal sódica o potásica.

25

Una forma adecuada de cromatografía para el proceso de separación es la cromatografía de líquidos a alta presión, por ejemplo empleando una solución acuosa tamponada de formiato amónico. Una vez que se han obtenido las fracciones que con-

30

1 tienen el compuesto deseado, puede obtenerse un preparado sólido por liofilización o similares.

5 Los compuestos de fórmula (Ia) y (Ib) pueden separarse por cromatografía en columna sobre soportes como celulosa acetilada, eluyendo con mezclas de alcohol y agua. Los compuestos de fórmula (IIa) y (IIb) también pueden separarse por técnicas cromatográficas similares.

10 Una vez que se han obtenido las fracciones que contienen el compuesto deseado, puede obtenerse un preparado sólido por liofilización o similares.

15 Esta invención proporciona un procedimiento para la preparación de una sal del compuesto de fórmula (Ia) esencialmente exenta del compuesto de fórmula (Ib), cuyo procedimiento consiste en someter una mezcla de dichas sales a separación cromatográfica sobre Diaion HP20 o una resina cromatográfica-mente equivalente.

20 Esta invención proporciona un procedimiento para la preparación de una sal del compuesto de fórmula (Ib) esencialmente exenta del compuesto de fórmula (Ia), cuyo procedimiento consiste en someter una mezcla de dichas sales a separación cromatográfica sobre Diaion HP20 o una resina cromatográfica-mente equivalente.

25 Esta invención proporciona un procedimiento para la preparación de una sal del compuesto de fórmula (IIa) esencialmente exenta del compuesto de fórmula (IIb), cuyo procedimiento consiste en someter una mezcla de dichas sales a separación cromatográfica sobre Diaion HP20 o una resina cromatográfica-mente equivalente.

30 Esta invención proporciona un procedimiento para la preparación de una sal del compuesto de fórmula (IIb) esencial-

1

mente exenta del compuesto de fórmula (IIa), cuyo procedimiento consiste en someter una mezcla de dichas sales a separación cromatográfica sobre Diaion HP20 o una resina cromatográficamente equivalente.

5

Las sales preparadas por los procedimientos anteriores serán normalmente sales monovalentes como sales metálicas alcalinas, por ejemplo la sal de litio, sodio o potasio y preferiblemente la sal sódica.

10

Las sales preparadas por el procedimiento anterior normalmente no contendrán más de alrededor del 5 % y todavía mejor no más de alrededor del 1 % del isómero indeseado.

15

El Diaion (que es una marca registrada) es un polímero altamente poroso fabricado por Mitsubishi Chemical Industries. No se trata de una resina cambiadora de ion sino de un adsorbente sintético con una superficie activa extraordinariamente grande en la cual pueden adsorberse eficazmente los compuestos orgánicos.

20

El Diaion HP20 es un copolímero de estireno/divinilbenzeno en forma de perlas, con una estructura macrorreticular con una superficie específica de alrededor de  $7,8 \text{ m}^2/\text{g}$  y un volumen de poros de  $1,16 \text{ ml/g}$ . Otros detalles de esta resina pueden encontrarse en el folleto de datos Diaion (serie HP, Octubre 1976, que se incorpora aquí) (las oficinas de la Mitsubishi Chemical Industries Ltd. pueden encontrarse en vía 5-2 Marunouchi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, Japón; 277 Park Ave., New York, N.Y. 10017, Estados Unidos; Ratinger Str. 45, 4 Duesseldorf, Alemania Occidental; etc).

25

30

Las resinas cromatográficamente equivalentes al Diaion HP20 normalmente también son física y químicamente similares, es decir, en general son resinas macrorreticulares a base de

1 copolímeros de estireno/divinilbenceno y exentas de grupos ionizados.

5 En el caso más adecuado, la mezcla de isómeros aplicada a la resina será de buena pureza y estará esencialmente exenta de otras impurezas orgánicas aunque puede haber presentes ciertas cantidades de impurezas inorgánicas (por ejemplo una sal metálica alcalina como un cloruro, v.g. cloruro sódico).

10 Adecuadamente el disolvente empleado será agua o una mezcla de agua y un alcohol inferior o un disolvente orgánico miscible similar.

Preferiblemente el disolvente empleado es el agua.

15 El material deseado puede obtenerse ahora separando el disolvente, por ejemplo por evaporación, liofilización o similares. Alternativamente, la solución puede ser recromatografiada directamente sobre una resina adecuada (como Biogel P2 y/o Diaion HP20) para purificarla más antes de separar el disolvente.

20 El agua puede separarse de las soluciones acuosas de las sales de esta invención por procedimientos como evaporación a vacío hasta 1/10 de su volumen, reconstitución al volumen original con etanol, reconcentración hasta aproximadamente 1/10 de su volumen a vacío, reconstitución del volumen original por adición de tolueno y evaporación a sequedad a vacío. Los disolventes residuales pueden eliminarse manteniendo bajo alto vacío.

DESCRIPCION 1

Preparación del caldo clarificado

30 Se utiliza una suspensión de esporas de Streptomyces olivaceus ATCC 31.126 para inocular 100 ml de un medio de

1 siembra contenido en un erlenmeyer de 500 ml, tapado con  
un tapón de espuma. El medio de siembra está constituido  
por 2 % de glucosa y 1 % de harina de semilla de soja en  
5 agua desionizada. (La harina de semilla de soja es Arkasoy  
50 suministrada por la British Arkady Co. Ltd., Old Trafford,  
Manchester, Reino Unido).

El medio de siembra se cultiva durante 48 horas en  
un sacudidor rotatorio a 26°C. Se utilizan partes alícuotas  
de 5 ml del medio de siembra para inocular porciones de 100  
10 ml del medio de fermentación contenido en erlenmeyers de  
500 ml tapados con tapones de espuma. El medio de fermenta-  
ción, que se prepara con agua desionizada, tiene la siguiente  
composición:

	%
15 Glucosa	2,0
Harina de semilla de soja	1,0
CaCO <sub>3</sub>	0,02
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0001

20 Los matraces de fermentación se incuban a 26°C en  
un sacudidor rotatorio durante 72 horas. Se cosechan 20 ma-  
traces y el caldo completo resultante se centrifuga a 2200 x  
g durante 10 minutos.

También se prefiere utilizar Streptomyces olivaceus  
25 ATCC 31365 en el procedimiento anterior.

#### DESCRIPCION 2

##### Preparación de antibióticos crudos en solución

30 El filtrado de cultivo (1500 ml) obtenido después  
de centrifugar se somete a purificación empleando una colum-  
na de carbón, como sigue:

Se prepara una columna de carbón granulado Darco de

1 2,5 x 37 cm en agua desionizada, se lava la columna sucesi-  
vamente con 1 litro de NaOH al 2 %, 1 litro de agua desioni-  
zada, 1 litro de HCl 1N y 1 litro de agua desionizada, todo  
ello a 15 ml/minuto. Después la columna se lava con tampón  
5 de fosfato 0,05M a pH 7 hasta que el pH del eluyente es  
de 7,0.

10 El filtrado del cultivo (1500 ml) se pasa por una  
columna de carbón a razón de 15 ml/minuto. Después la colum-  
na se eluye con acetona/agua 1:4 a 15 ml/minuto y se recogen  
fracciones de 22 ml. En las fracciones se determina la acti-  
vidad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa frente a un preparado  
de enzima R<sub>TEM</sub> (suministrado por Microbiological Research  
Establishment, Porton). Se combinan las fracciones que pre-  
sentan la máxima actividad (8-22) y se evaporan a presión  
15 reducida para eliminar la acetona. La solución acuosa resul-  
tante se almacena en un congelador intenso antes de su poste-  
rior transformación.

20 (El enzima R<sub>TEM</sub> es típico de las  $\beta$ -lactamasas con-  
troladas por plásmidos y puede ser sustituido por otro, como  
las  $\beta$ -lactamasas del factor R, si se desea).

#### EJEMPLO 1

Aislamiento de los compuestos de fórmulas (I) y (II) en for-  
ma de sus sales sódicas esencialmente exentas de sales de

MM 4550, MM 13.902 y MM 17.880

25 El líquido crudo obtenido en la Descripción 2 se  
evapora a presión reducida hasta 20 ml aproximadamente y se  
carga en una columna cambiadora de anión débilmente básica  
de 3,8 x 27 cm de celulosa DEAE (la celulosa DEAE es celulosa  
DE 52 suministrada por Whatman Ltd., Springfield Mill,  
30 Maidstone, Kent, Inglaterra) preparada en tampón de fosfato

1 0,025M a pH 7. La columna se eluye con tampón de fosfato  
0,025M a pH 7 a un caudal de 8 ml/minuto y se recogen frac-  
ciones de 25 ml. En las fracciones se determina su actividad  
inhibidora de  $\beta$ -lactamasa frente a un preparado de  $\beta$ -lacta-  
5 masa de R<sub>TEM</sub>. Se retienen los dos primeros picos de activi-  
dad inhibidora. Se combinan las fracciones de la primera  
banda (13-16) que contienen la sal del compuesto de fórmula  
(I) y se liofilizan para dar un preparado sólido que contie-  
ne la sal sódica del compuesto de fórmula (I) esencialmente  
10 exento de las sales de los antibióticos dibásicos. Se combi-  
nan las fracciones de la segunda banda (19-21) que contienen  
la sal del compuesto de fórmula (II) y se liofilizan para  
dar un preparado sólido que contiene la sal sódica del com-  
puesto de fórmula (II) esencialmente exenta de las sales de  
15 los antibióticos dibásicos.

(La liofilización de las fracciones 13-16 y 19-21  
combinadas conduce naturalmente a un preparado que contiene  
una mezcla de las sales sódicas de los antibióticos de fórmu-  
las (I) y (II). Las sales disódicas de los antibióticos  
20 MM 4550, MM 13.902 y MM 17.880 eluyen después de las sales  
deseadas).

#### EJEMPLO 2

#### Purificación parcial de las sales sódicas de los compuestos de fórmula (I)

25 El preparado liofilizado de la sal del compuesto del  
Ejemplo 1 se disuelve en 10 ml de agua desionizada y se aña-  
de 1 g de cloruro sódico a la solución. Esta solución se ha-  
ce pasar por una columna de 1,5 x 15 cm de XAD-4 (suministra-  
do por Rohm & Haas), preparada en agua desionizada. La colum-  
30 na se eluye con agua/n-propanol 4:1 a razón de 2 ml/minuto y

1 se recogen fracciones de 4 ml. En las fracciones se determi-  
na el cloruro por reacción con nitrato de plata y la activi-  
dad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa frente a un preparado de  
5  $\beta$ -lactamasa de  $R_{TEM}$ . Se combinan las fracciones con la máxi-  
ma actividad inhibidora y que dan reacción negativa con el  
nitrato de plata (fracciones 6 a 13) y se liofilizan para  
dar 32,5 mg de un sólido amorfo que contiene la sal sódica  
del compuesto de fórmula (I).

Las propiedades de este preparado son las siguientes:

10 (A) Propiedades cromatográficas

(i) Cromatografía en papel cambiador de ion Whatman DE81  
(papel cambiador de anión débilmente básico):

Eluyente	$R_f$ de la sal sódica
1. Tampón de fosfato 0,05M, pH 7	0,69
2. Tampón de fosfato 0,05M, pH 7, conte- niendo NaCl 0,2M	0,80

(ii) Cromatografía sobre papel Whatman n° 1:

Sistema disolvente	$R_f$ de la sal sódica
1. Fase superior de butanol/eta- nol/agua 4:1:5	0,12
2. Butanol/piridina/agua 1:1:1	0,42

20 (B) Electroforesis en papel a alto voltaje

La electroforesis se realiza en papel n° 20 en tampón de  
piridina/ácido acético pH 5,3, a 5000 voltios durante 15 mi-  
25 nutos. El valor de  $R_M$  para la sal sódica tomando las ben-  
cilpenicilinas como 1,0 es también 1,0.

(C) Actividad antibacteriana

Se determinó la siguiente actividad antibacteriana del  
preparado, utilizando el método de microvaloración:

1	<u>Organismo</u>	<u>CMI (µg/ml)</u>
	Bacillus subtilis A	<40
	Enterobacter cloacae N1	1250
	Escherichia coli 10418	150
5	E. coli JT 410	625
	Klebsiella aerogenes A	312
	Proteus mirabilis C977	625
	Pseudomonas aeruginosa A	>2500
	Salmonella typhimurium CT10	312
10	Serratia marcescens US39	625
	Staph. aureus Russell	150

(D) Inhibición de enzima

La actividad inhibidora de enzimas del preparado frente a una serie de preparados de β-lactamasa es la siguiente:

15	<u>Preparado de β-lac tamasa de:</u>	<u>% de inhibi ción a 200 µg/ml</u>	<u>Concentración que pro duce un 50 % de inhi bición, µg/ml</u>
	Staph. aureus Russell	40	
	E. coli JT4	-	95
	Proteus mirabilis C889	-	112
20	Pseudomonas aeruginosa Dalglish	-	170
	Enterobacter cloacae P99	83	
	Pseudomonas aeruginosa A	30	
	Klebsiella aerogenes E70	27	

(Método de la patente belga n° 827.926).

EJEMPLO 3

Purificación parcial de la sal sódica de los compuestos de  
fórmula (II)

El preparado liofilizado de la sal del compuesto (II) del Ejemplo 1 se disuelve en 10 ml de agua desionizada y se

30

1 añade 1 g de cloruro sódico a la solución. Esta solución se  
aplica a una columna de 1,5 x 15 cm de XAD-4 (suministrado  
por Rohm & Haas), preparada en agua desionizada. La columna  
5 se eluye con agua/n-propanol 4:1 a 2 ml/minuto y se recogen  
fracciones de 4 ml. En las fracciones se determina el cloru-  
ro por reacción con nitrato de plata y la actividad inhibi-  
dora de  $\beta$ -lactamasa frente a un preparado de  $\beta$ -lactamasa  
de  $R_{TEM}$ . Se combinan las fracciones con la máxima actividad  
10 inhibidora y que dan una reacción negativa con el nitrato  
de plata (fracciones 7 a 13) y se liofilizan para dar 32,5  
mg de un sólido amorfo que contiene la sal sódica del com-  
puesto de fórmula (II).

Las propiedades de este preparado son las siguientes:

15 (A) Propiedades cromatográficas

(i) Empleando papel cambiador de anión débilmente bá-  
sico de celulosa DE81 (Whatman) la sal sódica tiene una  $R_f$   
de 0,54 cuando se eluye con tampón de fosfato 0,05M a pH 7.

(ii) Empleando papel Whatman n° 1, la sal sódica pre-  
senta una  $R_f$  de 0,20 cuando se eluye con la fase superior  
20 de butanol/etanol/agua 4:1:5.

(B) Electroforesis en papel a alto voltaje

La electroforesis se realiza en papel Whatman n° 20 en  
tampón de piridina/ácido acético pH 5,3, a 5000 voltios du-  
rante 15 minutos. El valor de  $R_M$  para la sal tomando la ben-  
cilpenicilina como 1,0 es 0,95.

25 (C) Actividad antibacteriana

Se determinó la actividad antibacteriana del preparado  
empleando el método de microvaloración con los siguientes  
30 resultados:

1	<u>Organismo</u>	<u>CMI, µg/ml</u>
	Bacillus subtilis A	250
	Enterobacter cloacae N1	> 1000
	Escherichia coli 10418	250
5	Klebsiella aerogenes A	500
	Proteus mirabilis C977	500
	Pseudomonas aeruginosa A	>1000
	Salmonella typhimurium CT10	250
	Serratia marcescens US39	>1000
10	Staph. aureus Oxford	500
	Staph. aureus Russell	250

(D) Inhibición de enzima

Se determinó la actividad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa del preparado frente a una serie de preparados enzimáticos:

15	Preparado de $\beta$ -lactamasa de:	% de inhibición a 200 µg/ml	Concentración que produce una inhibición del 50% µg/ml
	Staph. aureus Russell	-	150
	E. coli JT4	-	72
20	Proteus mirabilis C889	-	62
	Pseudomonas aureginosa Dalglish	-	53
	Enterobacter cloacae P99	-	10
	Pseudomonas aeruginosa A	39	
	Klebsiella aerogenes E70	13	

25 EJEMPLO 4

Purificación más avanzada de las sales sódicas de los compuestos de fórmula (I)

El preparado obtenido en el Ejemplo 2 se disuelve en agua desionizada y se carga en una columna de QAE Sephadex A25 (QAE Sephadex A25 es una resina cambiadora de anión fuer-

30

1 temente básica suministrada por Pharmacia Ltd.), preparada  
en agua desionizada. La columna se eluye con un gradiente  
de concentración de cloruro sódico desde 0 a 0,18M de NaCl  
en agua desionizada. En las fracciones de la columna se de-  
5 termina la actividad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa frente a  
un preparado de R<sub>TEM</sub> y se combinan las que presentan la má-  
xima actividad. Se agrega a las fracciones combinadas NaCl  
hasta una concentración final del 5 % como mínimo. La solu-  
ción resultante se pasa por una columna de Amberlite XAD  
10 (Rohm & Haas Ltd.) y la columna se eluye con n-propanol/agua  
1:4. Se combinan las fracciones que contienen la sal deseada,  
a juzgar por su actividad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa, se  
evaporan a vacío para separar el disolvente orgánico y se  
liofilizan.

15

EJEMPLO 5

Purificación más avanzada de las sales sódicas de los com-  
puestos de fórmula (I)

20

Las fracciones combinadas de la cromatografía en QAE  
Sephadex del Ejemplo 4 pueden ser desalificadas y purifica-  
das todavía más por cromatografía en una columna de gel  
Bio-gel P2 (Bio-Rad Laboratories Ltd., 27 Homesdale Road,  
Bromley, Kent, Inglaterra) como sigue:

25

El sólido liofilizado de la columna de QAE Sephadex  
se disuelve en un pequeño volumen de agua desionizada y se  
pasa por una columna de Bio-gel P2. La columna se eluye con  
butanol acuoso al 1 %. Se determina la actividad inhibidora  
de la  $\beta$ -lactamasa de cada fracción y la reacción con nitra-  
to de plata. Las fracciones que dan una reacción negativa  
con nitrato de plata pero presentan una actividad inhibidora  
de la  $\beta$ -lactamasa adecuada se combinan y liofilizan.

30

EJEMPLO 6

Purificación más avanzada de las sales sódicas de los compuestos de fórmula (I)

El preparado obtenido en el Ejemplo 2 se disuelve en agua desionizada y se aplica a una columna de la resina cambiadora de anión fuertemente básica Amberlite IRA 458 (Rohm & Hass (UK) Ltd., Lenning House, 2 Mason Ave., Croydon, Reino Unido). La columna se prepara en tampón de fosfato 0,05M a pH 7 y se eluye con un gradiente de cloruro sódico en tampón de fosfato. La elución se realiza desde fosfato 0,05M pH 7 a fosfato 0,05M pH 7 conteniendo NaCl 1,0M. Se combinan las fracciones que presentan la máxima actividad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa. Se agrega NaCl a las fracciones combinadas para dar una concentración del 5 % como mínimo. La solución resultante se aplica a una columna de Amberlite XAD-4 preparada en agua desionizada. La columna se eluye con n-propanol/agua 1:4. Se combinan las fracciones que presentan la máxima actividad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa pero que dan una reacción negativa con el nitrato de plata y se liofilizan.

EJEMPLO 7

Purificación más avanzada de las sales sódicas de los compuestos de fórmula (I)

La sal del compuesto de fórmula (I) puede purificarse todavía más por cromatografía en una columna de celulosa (celulosa CC31 Whatman, Springfield Mill. Maidstone, Kent, Reino Unido) como sigue:

El sólido impuro que contiene la sal del compuesto de fórmula (I) se disuelve en una cantidad mínima de agua desionizada y se agrega n-propanol hasta el 50 % aproximadamente.

1 La solución resultante se aplica a una columna de celulosa  
que se eluye con n-propanol/agua 4:1. Las fracciones resul-  
tantes después de diluir en agua desionizada se examinan pa-  
ra determinar su actividad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa. Se  
5 combinan las fracciones que contienen la sal deseada, se eva-  
poran a presión reducida para eliminar el disolvente y se  
liofiliza.

EJEMPLO 8

10 Purificación más avanzada de las sales sódicas de los com-  
puestos de fórmula (II)

Puede utilizarse el procedimiento del Ejemplo 4 pero  
sustituyendo el material de partida por la preparación obte-  
nida en el Ejemplo 3.

EJEMPLO 9

15 Purificación más avanzada de las sales sódicas de los com-  
puestos de fórmula (II)

Puede utilizarse el procedimiento del Ejemplo 5 pero  
sustituyendo el material de partida por el producto del  
Ejemplo 8.

EJEMPLO 10

20 Purificación más avanzada de las sales sódicas de los com-  
puestos de fórmula (II)

Puede utilizarse el procedimiento del Ejemplo 6 pero  
sustituyendo el material de partida por el preparado obteni-  
do en el Ejemplo 3.

EJEMPLO 11

25 Purificación más avanzada de las sales sódicas de los com-  
puestos de fórmula (II)

30 Puede utilizarse el procedimiento del Ejemplo 7 pero  
sustituyendo el material de partida por el preparado obteni-

1 do en el Ejemplo 3.

EJEMPLO 12

Preparación de antibióticos crudos a partir del filtrado  
del cultivo

5 Se aplican 80 ml de filtrado de cultivo, preparado esencialmente como se ha descrito en la Descripción 1, a una columna de 1,5 x 15 cm de Amberlite IRA 458, una resina cambiadora de anión de base acrílica, fuertemente básica (Rohm & Haas). La columna se eluye con un gradiente de concentraciones de cloruro sódico. El gradiente oscila entre  
10 NaCl 0 y 1,0M en tampón de fosfato 0,05M a pH 7, a un caudal de 2,5 ml/minuto y se recogen fracciones de 5 ml. En las fracciones se determina la actividad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa frente a un preparado de  $\beta$ -lactamasa de R<sub>TEM</sub>. Se combinan las fracciones que dan una buena actividad inhibidora  
15 y que contienen las sales sódicas de los compuestos de fórmulas (I) y (II) (4-13). (Las sales disódicas de MM 4550, MM 13902 y MM 17880 comienzan a eluir a partir de la fracción 17).

20 A las fracciones combinadas se añaden 3 g de cloruro sódico y la solución resultante se aplica a una columna de 1,5 x 15 cm de Amberlite XAD-4 (Rohm & Haas), preparada en agua desionizada. La columna se eluye con n-propanol/agua  
25 1:4 a 3 ml/minuto y se recogen fracciones de 4 ml. En las fracciones se determina la actividad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa y la reacción con una solución de nitrato de plata. Se combinan las fracciones que dan una buena actividad inhibidora y reacción negativa con el nitrato de plata y se liofilizan para formar un preparado parcialmente purificado de  
30 las sales sódicas de los compuestos de fórmulas (I) y (II).

1 El preparado impuro puede ser purificado más mediante los procedimientos descritos anteriormente.

EJEMPLO 13

Preparación de antibióticos crudos a partir del filtrado del  
5 cultivo

Se pasan 305 ml de filtrado de cultivo, preparado esencialmente como se ha descrito en la Descripción 1, por una columna de 1,5 x 15 cm de Amberlite IRA 458, una resina cambiadora de anión de base acrílica, fuertemente básica (Rohm & Haas). La columna se lava con 100 ml de agua desionizada a 5 ml/minuto y se eluye con tampón de fosfato 0,025M a pH 7, a 5 ml/minuto, recogiendo fracciones de 10 ml. En las fracciones se determina la actividad inhibidora de  $\beta$ -lactamasa frente a un preparado de  $\beta$ -lactamasa de R<sub>TEM</sub>. Se combinan las fracciones que dan una buena actividad inhibidora y que contienen las sales sódicas de los compuestos de fórmulas (I) y (II) (13-32). Las fracciones combinadas se liofilizan. El sólido liofilizado se disuelve en 20 ml de agua desionizada, se agregan 2 g de NaCl y la solución resultante se pasa por una columna de 1,5 x 15 cm de Amberlite XAD-4 (Rohm & Haas), preparada en agua desionizada. La columna se eluye con n-propanol/agua 1:4 a 2 ml/minuto y se recogen fracciones de 4 ml. En las fracciones se determina la actividad inhibidora de  $\beta$ -lactamasa y la reacción con solución de nitrato de plata. Se combinan las fracciones (7-14) con buena actividad inhibidora y reacción negativa con el nitrato de plata y se liofilizan para formar un preparado parcialmente purificado de las sales de los compuestos de fórmulas (I) y (II). Este preparado impuro puede ser purificado más por los procedimientos descritos anteriormente.

10

15

20

25

30

EJEMPLO 14

Condiciones de fermentación para fermentación de 300 litros

Una ampolla liofilizada de Streptomyces olivaceus (ATCC 31365) se resuspende en 10 ml de una solución estéril de la siguiente composición:

Glucosa 2 %

Harina de semilla de soja 1 %

pH 6,5

preparada en agua desionizada. (La harina de semilla de soja es Arkasoy 50 suministrada por la British Arkady Co. Ltd., de Old Trafford, Manchester).

Se utiliza 1 ml de esta suspensión para inocular 100 ml de medio de la misma composición, contenidos en un erlenmeyer de 500 ml, tapado con un tapón de espuma. Después de la inoculación, el matraz se incuba en un sacudidor rotatorio a 28°C durante 30 horas. Se utilizan partes alícuotas de 5 ml de este cultivo de siembra para inocular unos tubos inclinados de agar sólido en frascos Roux de la siguiente composición:

Jugo de vegetales V8 20,0 %

Agar Bacto (Difco) 2,5 %

pH 6,0

preparado en agua desionizada. (El jugo de vetales V8 es suministrado por Campbell Soups Ltd., Kings Lynn, Norfolk, Inglaterra y el agar Bacto es suministrado por Difco Laboratories, Detroit, Michigan, Estados Unidos).

Cada frasco Roux se incubaa 28°C durante una semana.

Transcurrido ese tiempo, se añaden al cultivo de un frasco

Roux 100 ml de agua desionizada estéril conteniendo 0,1.% de

1 Triton X (agente tensoactivo, marca registrada) y las esporas se suspenden mediante sacudidas. Esta suspensión de esporas se agrega como inoculum a 75 litros de un medio esterilizado de fase de siembra en un fermentador de acero inoxidable con tabiques. La composición del medio es:

Harina de semilla de soja (Arkasoy 50)	1 %
Glucosa	2 %
Antiespumante Pluronic L81	0,03 %

5  
10 preparada en agua destilada (Pluronic L81 es suministrado por Ugine Kuhlmann Chemicals Ltd.).

El medio se esteriliza a vapor en el fermentador durante 20 minutos a 120°C. El cultivo de siembra se agita a 140 rpm con un agitador de disco de paletas de 7,5" (19 cm) y se suministra aire estéril a 75 litros/minuto a través de un rociador de extremos abiertos. La temperatura se controla a 28°C y después de incubar en estas condiciones durante 48 horas se agregan 7,5 litros de este cultivo de siembra como inoculum a 150 litros de un medio de fermentación estéril contenido en un fermentador de acero inoxidable de 300 litros, totalmente tabicado. El medio de fermentación tiene la siguiente composición:

Harina de semilla de soja (Arkasoy 50)	0,9 %
Glucosa	2,0 %
Greda	0,02 %
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0001 %
Antiespumante Pluronic L81	0,2 %

25  
30 pH 6,0 antes de la esterilización  
preparado en agua destilada.

El medio de fermentación se agita a 340 rpm con un

1 propulsor de turbina de 8,5" (21,5 cm). La temperatura se controla a 29°C, suministrándose aire a un caudal de 50 litros/minuto y manteniendo el pH a 6,5-7,0.

5 Estas fermentaciones pueden ser cosechadas al cabo de periodos de tiempo que oscilan entre 48 y 54 horas.

EJEMPLO 15

Condiciones de fermentación para 2000 litros

10 Las condiciones de fermentación hasta la fase de siembra inclusive son esencialmente las descritas en el Ejemplo 14. Se utilizan 75 litros de esta siembra para inocular 1500 litros de un medio de fermentación estéril contenido en un fermentador de acero inoxidable de 2000 litros, totalmente tabicado. El medio de fermentación es el mismo descrito en el Ejemplo 14.

15 La fermentación se agita con dos propulsores de turbina de 19" (48 cm) de diámetro a 106 rpm, suministrándose aire a un caudal de 400 litros/minuto. La temperatura se mantiene a 29°C y el pH a 6,5-7,0; el fermentador se cosecha al cabo de 48 horas.

20 EJEMPLO 16

Procedimiento de aislamiento para la preparación de sales sódicas esencialmente puras de los compuestos de fórmulas (I)

Y (II)

25 Se clarifican en una centrífuga de flujo continuo (Sharples Super Centrifuge) 150 litros de caldo completo, preparados esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 14, aproximadamente a razón de 2,4 litros/minuto. Ciento veinte litros del filtrado de cultivo clarificado son percolados sobre una columna de 6" (15 cm) de diámetro de la resina cambiadora de anión fuertemente básica Amberlite IRA 458 (en forma cloruro)

30

1 suministrada por Rohm & Haas Co., Philadelphia, Pa., Estados Unidos, con un volumen de lecho de 9,6 litros y a un caudal de 400 ml/minuto. (La columna de Amberlite IRA 458 ha sido previamente preparada en agua desionizada). Después

5 de percolar el filtrado de cultivo, la columna se lava con la mitad del volumen del lecho de agua y después se eluye con NaCl 0,2M en tampón de fosfato sódico 0,05M, pH 7, a un caudal de 230 ml/minuto. Se recogen fracciones de 2 litros y se combinan las que presentan buena actividad inhibidora frente a un preparado de  $\beta$ -lactamasa mediado por  $R_{TEM}$  (fracciones 2-11). Se agregan 46,75 g/l de cloruro sódico a las fracciones combinadas para formar una solución 1M con respecto al NaCl. La solución resultante se pasa por una

10 columna de 4" (10 cm) de diámetro de Amberlite XAD-4 (suministrado por Rohm & Haas Co.) con un volumen del lecho de 4 litros y equilibrada en NaCl 1M. La velocidad de percolación es de 200 ml/minuto. La columna se eluye con 10 litros de agua desionizada y después con agua/isopropanol 4:1, ambas a 100 ml/minuto. Las fracciones que presentan buena

15 actividad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa frente a un preparado de enzima  $R_{TEM}$  (3-10 y 3-17) se combinan, se evaporan a presión reducida para separar el isopropanol y se liofilizan.

20 Se prepara en agua desionizada una columna de 3,8 x 30 cm de la celulosa DE52 cambiadora de anión débilmente básica (en forma de cloruro) (suministrada por Whatman Ltd., Springfield Mill, Maidstone, Kent, Inglaterra). El sólido liofilizado de la fase de desalificación se disuelve en

25 300 ml de agua desionizada y se pasa por la columna de celulosa DE52 a 6 ml/minuto. La columna se lava con 200 ml de

30 agua desionizada y se eluye con tampón de fosfato potásico

1 0,025M, pH 7, a 2,5 ml/minuto, recogiendo fracciones de  
10 ml. En las fracciones se determina la actividad inhibi-  
5 dora de la  $\beta$ -lactamasa y se combinan independientemente los  
dos primeros picos principales de actividad, fracciones 30-  
85 (que contienen la sal sódica del compuesto de fórmula (I))  
y las fracciones 86-130 (que contienen la sal sódica del  
compuesto de fórmula (II)).

10 Las fracciones 30-85 combinadas se pasan por una colum-  
na de 3,8 x 29 cm de QAE Sephadex A25 (en forma de cloruro)  
(suministrada por Pharmacia Ltd., Uppsala, Suecia), prepara-  
da en agua desionizada. La columna se eluye con NaCl 0,1M a  
3 ml/minuto y se recogen fracciones de 18 ml. Se combinan  
las fracciones que presentan una buena actividad inhibidora  
de la  $\beta$ -lactamasa de R<sub>TEM</sub> (58-68). A 180 ml de esta solución  
15 se añaden 9 g de cloruro sódico y la solución resultante se  
pasa por una columna de 1,5 x 15 cm de Amberlite XAD-4. La  
columna se eluye con 135 ml de agua desionizada y después  
con agua/isopropanol 4:1 a 3 ml/minuto, recogiendo fraccio-  
20 nes de 4,5 ml. Se combinan las fracciones con las caracterís-  
ticas del espectro ultravioleta propias de las sales sódicas  
parcialmente purificadas de los compuestos de fórmula (I)  
(máximo UV 297 m $\mu$  aproximadamente) (8-16 y 34-40) y se liofi-  
lizan para dar respectivamente 53 mg y 42 mg de un sólido  
25 con propiedades características de las sales sódicas esencial-  
mente puras de los compuestos de fórmula (I).

30 Las fracciones 86-130 de la columna de celulosa DE52  
se pasan por una columna de 3,8 x 29 cm de QAE Sephadex A25  
(en forma de cloruro) y la columna se eluye con NaCl 0,1M a  
3 ml/minuto, recogiendo fracciones de 18 ml. En las fraccio-  
nes se determina la actividad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa

1 de  $R_{TEM}$  y se combinan las que presentan buena actividad (94-  
100) (120 ml). Se añaden 6 g de cloruro sódico a las fraccio-  
5 nes combinadas y la solución resultante se pasa por una colum-  
na de 1,5 x 15 cm de Amberlite XAD-4. La columna se eluye  
con 90 ml de agua desionizada y después con agua/isopropanol  
4:1, ambos a razón de 3 ml/minuto y se recogen fracciones de  
4 ml. Se combinan las fracciones con el espectro caracterís-  
tico de las sales sódicas impuras de los compuestos de fór-  
mula (II) (máximo a 307 m $\mu$  aproximadamente) (10-16 y 26-32)  
10 y se liofilizan para dar respectivamente 9,7 mg y 21,7 mg  
de sólido. Estos sólidos tienen propiedades que concuerdan  
con las de las sales sódicas esencialmente puras de los com-  
puestos de fórmula (II).

EJEMPLO 17

15 Otro procedimiento de aislamiento de las sales sódicas de  
los compuestos de fórmulas (I) y (II)

Se someten a cromatografía en Amberlite IRA 458 (en la  
forma de cloruro) 120 litros de un filtrado de cultivo que  
20 contiene las sales sódicas de los compuestos de fórmulas (I)  
y (II) y se desalifican en Amberlite XAD-4 esencialmente como  
se ha descrito en el Ejemplo 16 anterior.

El sólido liofilizado de la fase de desalificación se  
disuelve en 300 ml de agua desionizada y se pasa por una co-  
lumna de 3,8 x 25 cm de celulosa DE52 (en la forma de cloruro).  
25 La columna se lava con 200 ml de agua desionizada y se eluye  
con tampón de fosfato potásico 0,025M, pH 7, a 6 ml/minuto,  
recogiéndose fracciones de 20 ml. Se combinan las fracciones  
que presentan buena actividad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa  
de  $R_{TEM}$  (350 ml) y se pasan por una columna de QAE Sephadex  
30 A25 de 3,8 x 30 cm. La columna se eluye con NaCl 0,18M a 3 ml/

1 minuto y se recogen fracciones de 20 ml. En las fracciones  
se determina el espectro ultravioleta y las que presentan  
la absorción característica de las sales sódicas de los com-  
puestos de fórmula (I) (50-56) y la absorción característica  
5 de las sales sódicas del compuesto de fórmula II) (88-97)  
se combinan independientemente.

10 A las fracciones combinadas 50-56 se añaden 15 g de  
cloruro sódico y la solución resultante se pasa por una co-  
lumna de Amberlite XAD-4 de 1,5 x 15 cm. La columna se lava  
con 15 ml de agua desionizada y se eluye con agua/n-propanol  
4:1 a 3 ml/minuto. Se recogen fracciones de 3 ml. Se combi-  
nan las fracciones con el espectro ultravioleta característi-  
co de las sales sódicas purificadas de los compuestos de fór-  
mula (I) (9-15), se evaporan a presión reducida para separar  
15 el propanol y se liofilizan para dar 35 mg de un sólido con  
propiedades que concuerdan con las de las sales sódicas esen-  
cialmente puras de los compuestos de fórmula (I).

20 A las fracciones combinadas 88-97 de la columna de  
QAE Sephadex se añaden 24 g de cloruro sódico y la solución  
se percuela a través de una columna de Amberlite XAD-4 (1,5 x  
15 cm). La columna se eluye con agua/n-propanol 4:1 después  
de lavar con 15 ml de agua desionizada. Se combinan las frac-  
ciones con espectros ultravioleta característicos de las sa-  
les sódicas esencialmente puras de los compuestos de fórmu-  
25 la (II). Las fracciones combinadas se evaporan a presión re-  
ducida para separar el propanol y se liofilizan para dar las  
sales sódicas esencialmente puras de los compuestos de fór-  
mula (II) (34 mg).

30

EJEMPLO 18

Otro procedimiento de aislamiento de las sales sódicas de los compuestos de fórmulas (I) y (II)

Se preparan 105 litros de un filtrado de cultivo esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 16 y se trata sobre Amberlite IRA 458 y Amberlite XAD-4 como se ha descrito en el mismo ejemplo.

Se evaporan las fracciones combinadas de la columna de Amberlite XAD-4 hasta aproximadamente la mitad de su volumen a presión reducida para separar el isopropanol y se mantienen a 5°C durante 65 horas aproximadamente. La solución resultante (800 ml) se pasa por una columna de 3,8 x 30 cm de QAE Sephadex A25, previamente preparada en agua desionizada. La columna se eluye con 800 ml de NaCl 0,05 M y después con NaCl 0,1M, en ambos casos a 4 ml/minuto y se recogen fracciones de 20 ml. En las fracciones se determina la actividad inhibidora de  $\beta$ -lactamasa de  $R_{TEM}$  y el espectro ultravioleta y se combinan independientemente las que contienen esencialmente las sales sódicas de los compuestos de fórmula (I) (73-80) y las sales sódicas de los compuestos de fórmula (II) (112-125). Las fracciones combinadas 73-80 se evaporan a presión reducida hasta 15 ml aproximadamente y se pasan por una columna de 3,8 x 30 cm de Biogel P2 (200-400 mallas) (suministrada por Bio Rad Laboratories, 27 Homesdale Road, Bromley, Kent, Reino Unido) previamente preparada en agua desionizada conteniendo 1 % de butanol. La columna se eluye a razón de 3 ml/minuto con agua desionizada que contiene 1 % de butanol y se recogen fracciones de 6 ml. En las fracciones se determina el espectro ultravioleta y la reacción con nitrato de plata. Se combinan las fracciones que contienen

1 las sales sódicas de los compuestos de fórmula (I) que dan  
reacción negativa con el nitrato de plata (29-32) y se lio-  
filizan para dar 72 mg de un sólido con las propiedades ca-  
5 racterísticas de la sal sódica purificada del compuesto de  
fórmula (I).

Las fracciones combinadas 112-125 se evaporan a pre-  
sión reducida hasta un volumen de 15 ml aproximadamente. Es-  
ta solución se cromatografía en una columna de 3,8 x 30 cm  
de Biogel P2 (preparada como en el caso anterior). La colum-  
10 na se eluye con agua desionizada que contiene 1 % de butanol  
a razón de 3 ml/minuto y se recogen fracciones de 6 ml. Se  
combinan las fracciones (43-48) que dan el espectro ultravio-  
leta característico de las sales sódicas de los compuestos  
de fórmula (II) pero que dan reacción negativa de cloruros.  
15 Las fracciones combinadas se liofilizan para dar 27 mg de un  
sólido con las propiedades características de las sales sódicas  
sustancialmente puras de los compuestos de fórmula (II).

EJEMPLO 19

20 Método alternativo de aislamiento de las sales sódicas de los  
compuestos de fórmulas (I) y (II)

Se clarifican por filtración mediante el auxiliar de  
filtración Dicalite 478, sobre un filtro rotatorio previamen-  
te recubierto, 1500 litros de caldo completo preparado esen-  
25 cialmente como se ha descrito en el Ejemplo 15 para dar 1400  
litros de filtrado del cultivo. Este filtrado del cultivo es  
percolado a través de una columna de Amberlite IRA 458 (forma  
de cloruro) de 12" (30 cm) de diámetro (volumen del lecho,  
100 litros); a una velocidad media de percolación de 4 litros/  
minuto. La columna se eluye a razón de 1,6 litros/minuto con  
30 NaCl 0,2M en tampón de fosfato sódico 0,05M, pH 6,7, y se

1       recogen fracciones de 20 litros. Se combinan las fracciones  
que presentan buena actividad antibacteriana cuando se ensa-  
yan sobre Klebsiella aerogenes A (una variante de NCTC 418)  
5       (1-5). Se agrega cloruro sódico a las fracciones combinadas  
hasta una concentración final de 1,0M y la solución resultan-  
te se aplica a una columna de 6" (15 cm) de diámetro de Amber-  
lite XAD-4 (volumen del lecho, 22,4 litros) a 1,2 litros/mi-  
nuto. La columna de Amberlite XAD-4 se eluye con 20 litros  
10       de agua desionizada seguido de agua/isopropanol 4:1 a 500  
ml/minuto y se recogen fracciones de 8 litros. Se combinan  
las fracciones que contienen las sales deseadas (2-4) (24 li-  
tros) y se concentran hasta 11,4 litros por evaporación. El  
concentrado se mantiene aproximadamente durante 65 horas a  
15       5°C después de ajustar a pH 7,0. Esta solución se concentra  
de nuevo a 3,75 litros y la solución resultante se pasa por  
una columna de 7,8 x 31 cm de celulosa DE52 a razón de 6 ml/  
minuto. La columna se eluye con tampón de fosfato potásico  
0,025M, pH 7, a razón de 4 ml/minuto y se recogen fracciones  
20       de 22 ml. En las fracciones se determina la actividad inhi-  
bidora de la  $\beta$ -lactamasa de  $R_{TEM}$ , combinándose independien-  
temente las fracciones 60-135 y 136-210 que presentan buena  
actividad.

25       Las fracciones combinadas 60-135 (1580 ml) se aplican  
a una columna de 4,8 x 25 cm de QAE Sephadex A25, a 6 ml/mi-  
nuto. Esta columna se eluye con NaCl 0,1M a 4 ml/minuto y  
se recogen fracciones de 20 ml. En las fracciones se deter-  
mina el espectro ultravioleta y se combinan las que presen-  
tan las características de las sales sódicas de los compues-  
tos de fórmula (I) (50-70), listas para la transformación  
30       subsiguiente.

1 Las fracciones combinadas 136-210 de la columna de  
celulosa DE52 se aplican a una columna de 4,8 x 26 cm de  
QAE Sephadex A25 a razón de 6 ml/minuto. La columna se elu-  
5 ye con NaCl 0,1M a 4 ml/minuto y se recogen fracciones de  
20 ml. Se combinan las fracciones que presentan el espectro  
de absorción característico de las sales parcialmente puri-  
ficadas de los compuestos de fórmula (II) (91-104). A las  
fracciones combinadas se añaden 25 g de cloruro sódico y la  
solución resultante se aplica a una columna de 2,4 x 32 cm  
10 de Amberlite XAD-4 a 6 ml/minuto. La columna se lava con 50  
ml aproximadamente de agua desionizada y se eluye con agua/  
n-propanol (4:1) a 5 ml/minuto, recogándose fracciones de  
10 ml. Se combinan las fracciones que dan reacción negativa  
15 de cloruros con nitrato de plata pero con el espectro ultra-  
violeta característico de las sales sódicas de los compuestos  
de fórmula (II) (17-30). Las fracciones combinadas se evaporan  
a presión reducida para separar el n-propanol y se liofilizan  
para dar 585 mg de las sales sódicas sustancialmente puras  
de los compuestos de fórmula (II).

20 EJEMPLO 20

Propiedades de las sales sódicas de los compuestos de fórmu-  
las (I) y (II).

1. Espectro ultravioleta:

25 La mezcla de sales sódicas de los compuestos de fórmula (I)  
presenta un máximo característico a 297 m $\mu$  aproximadamente.

La mezcla de sales sódicas de los compuestos de fórmula  
(II) presenta un máximo característico aproximadamente a  
307 m $\mu$  (uno de dos)

2. Las sales sódicas presentan absorciones características  
30 del carbonilo de  $\beta$ -lactama a 1750 cm<sup>-1</sup> en su espectro in-

1

frarrojo.

3. La actividad antibacteriana in vitro del material preparado esencialmente como se ha descrito antes es la siguiente:

5

Organismo	Sal sódica del compuesto de fórmula (I), CMI ( µg/ml)	Sal sódica del compuesto de fórmula (II), CMI ( µg/m)
Bacillus subtilis A	0,8	0,2
Enterobacter cloacae N1	25,0	25,0
10 Eschericha coli 10418	1,5	1,5
Klebsiella aerogenes A	12,5	6,25
Proteus mirabilis C977	6,25	6,25
Pseudomonas aeruginosa A	>100	>100
Salmonella typhimurium CT10	3,12	0,8
15 Serratia marcescens US39	50,0	25,0
Staphylococcus aureus Oxford	0,8	1,5
Staphylococcus aureus Russell	3,12	1,5

10

15

EJEMPLO 21

Preparación de las sales de los compuestos de fórmulas (Ia)

20

y (Ib)

Un preparado esencialmente puro de la mezcla de sales sódicas de los compuestos de fórmulas (Ia) y (Ib) se separa por cromatografía de líquidos a alta presión mediante el siguiente procedimiento:

25

Columna: 300 mm x 3,9 mm, rellena de Bondapack C18 µ (Waters Associates, Milford, Massachusetts, Estados Unidos).

Disolvente: Acetato amónico 0,05M, ajustado a pH 4,5 con ácido acético en una mezcla de 5 % de acetonitrilo y 95 % de agua

30

1 Caudal : 2,5 ml/minuto  
Detección : Absorbancia ultravioleta a 295 nm.  
Carga : 50 µl de una solución de 1,6 mg en 0,5 ml  
de agua.

5 Las dos sales sódicas se resuelven en dos picos con unos tiempos de retención de 3,45 y 4,45 minutos. El eluato de cada pico se combina independientemente y se neutraliza a pH 7 con solución diluída de hidróxido sódico.

10 Las soluciones combinadas separadas se evaporan para dar las sales sódicas deseadas de los compuestos de fórmulas (Ia) y (Ib).

EJEMPLO 22

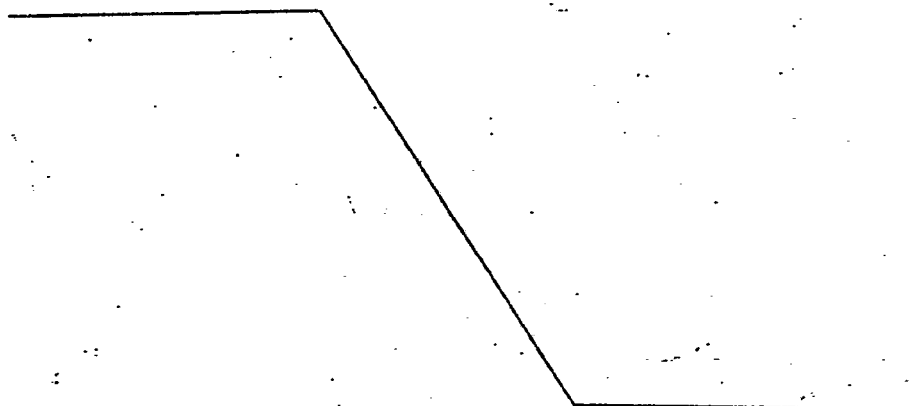
Separación de las sales de los compuestos de fórmulas (IIa) y (IIb)

15 Empleado el sistema descrito en el Ejemplo 21, se separa la mezcla de sales sódicas de los compuestos de fórmulas (IIa) y (IIb) por cromatografía de líquidos a alta presión, con unos tiempos de retención de 6,0 y 7,1 minutos.

20

25

30



EJEMPLO 23

FILTRADO DEL CULTIVO

ABSORCION SOBRE RESINA FUERTE-  
MENTE BASICA AMBERLITE IRA 458

Eluir con NaCl 0,2M en tampón

COMBINAR LAS FRACCIONES QUE  
CONTIENEN Ia, Ib, Iia y Iib

Desalificar sobre XAD-4  
Eluir con isopropanol/agua

EVAPORACION A PRESION REDUCIDA  
PARA SEPARAR EL PROPANOL

Cromatografía sobre QAE Sephadex

Ia, Ib

Iia, Iib

Desalificación  
sobre XAD-4

LIOFILIZACION DE LAS  
FRACCIONES SECAS QUE  
CONTIENEN Ia, Ib

Cromatografía  
sobre QAE Sephadex

FRACCION CONTENIENDO  
Ia, Ib

Cromatografía sobre  
Diaion HP20

FRACCIONES CONTENIEN  
DO Ia

Cromatografía sobre  
Biogel P2

FRACCIONES CONTENIEN  
DO Ia

FRACCIONES CONTENIEN  
DO Ib

FRACCIONES CONTENIEN  
DO Ib

Desalificación so-  
bre XAD-4

LIOFILIZACION DE LAS  
FRACCIONES SECAS QUE  
CONTIENEN Iia, Iib

Cromatografía  
sobre HP20

FRACCIONES CON  
TENIENDO Iia

Cromatografía  
sobre Biogel P2

FRACCIONES CON  
TENIENDO Iia

Cromatografía sobre  
HP20 y liofilización

Iia

Iib

1

5

10

15

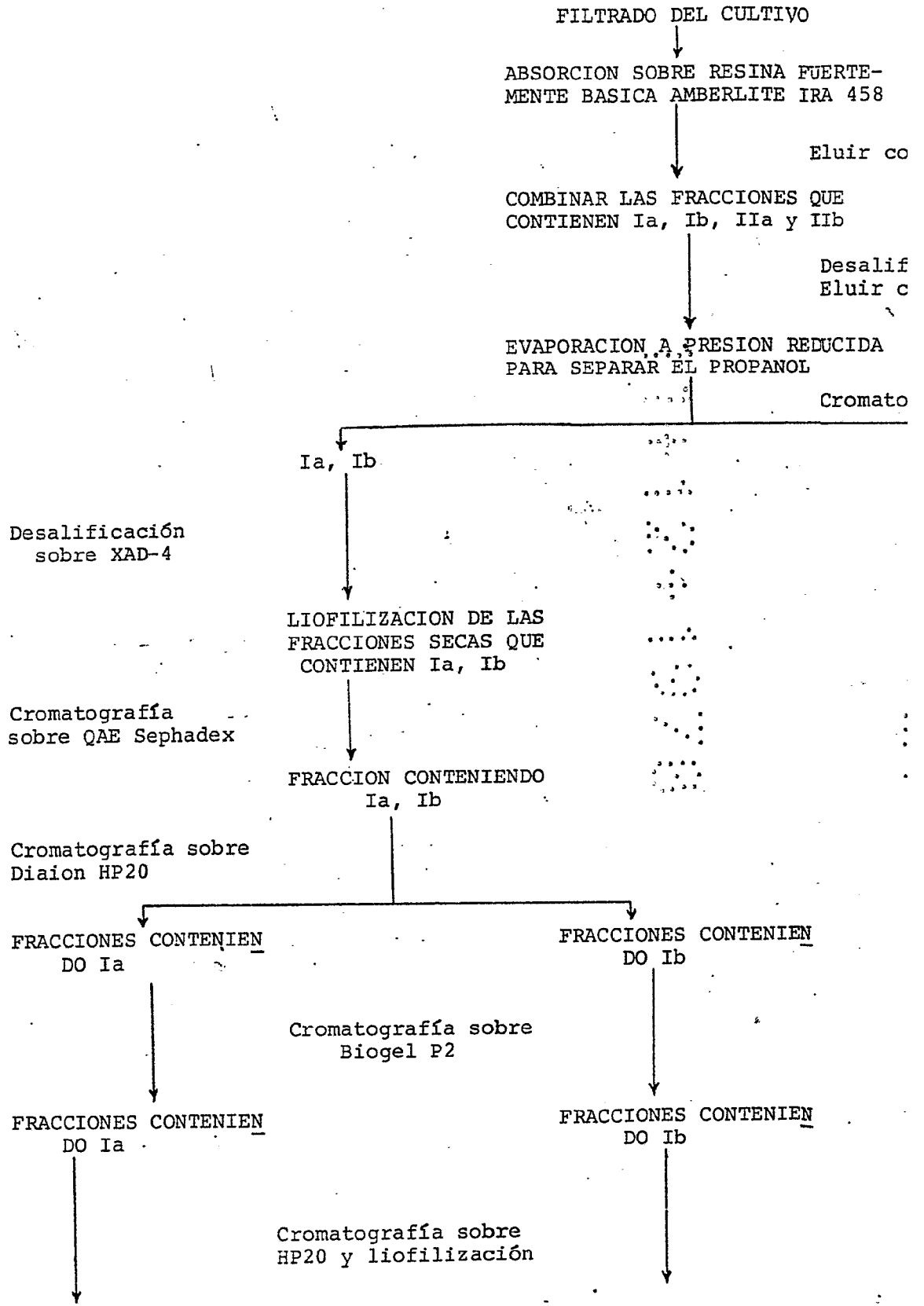
20

25

30

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

EJEMPLO 23



FILTRADO DEL CULTIVO

ABSORCION SOBRE RESINA FUERTEMENTE BASICA AMBERLITE IRA 458

Eluir co

COMBINAR LAS FRACCIONES QUE CONTIENEN Ia, Ib, IIa y IIb

Desalif  
Eluir c

EVAPORACION A PRESION REDUCIDA PARA SEPARAR EL PROPANOL

Cromato

Ia, Ib

Desalificación sobre XAD-4

LIOFILIZACION DE LAS FRACCIONES SECAS QUE CONTIENEN Ia, Ib

Cromatografía sobre QAE Sephadex

FRACCIÓN CONTENIENDO Ia, Ib

Cromatografía sobre Diaion HP20

FRACCIONES CONTENIENDO Ia

FRACCIONES CONTENIENDO Ib

Cromatografía sobre Biogel P2

FRACCIONES CONTENIENDO Ia

FRACCIONES CONTENIENDO Ib

Cromatografía sobre HP20 y liofilización

30

EJEMPLO 23

FILTRADO DEL CULTIVO

↓  
ABSORCION SOBRE RESINA FUERTE-  
MENTE BASICA AMBERLITE IRA 458

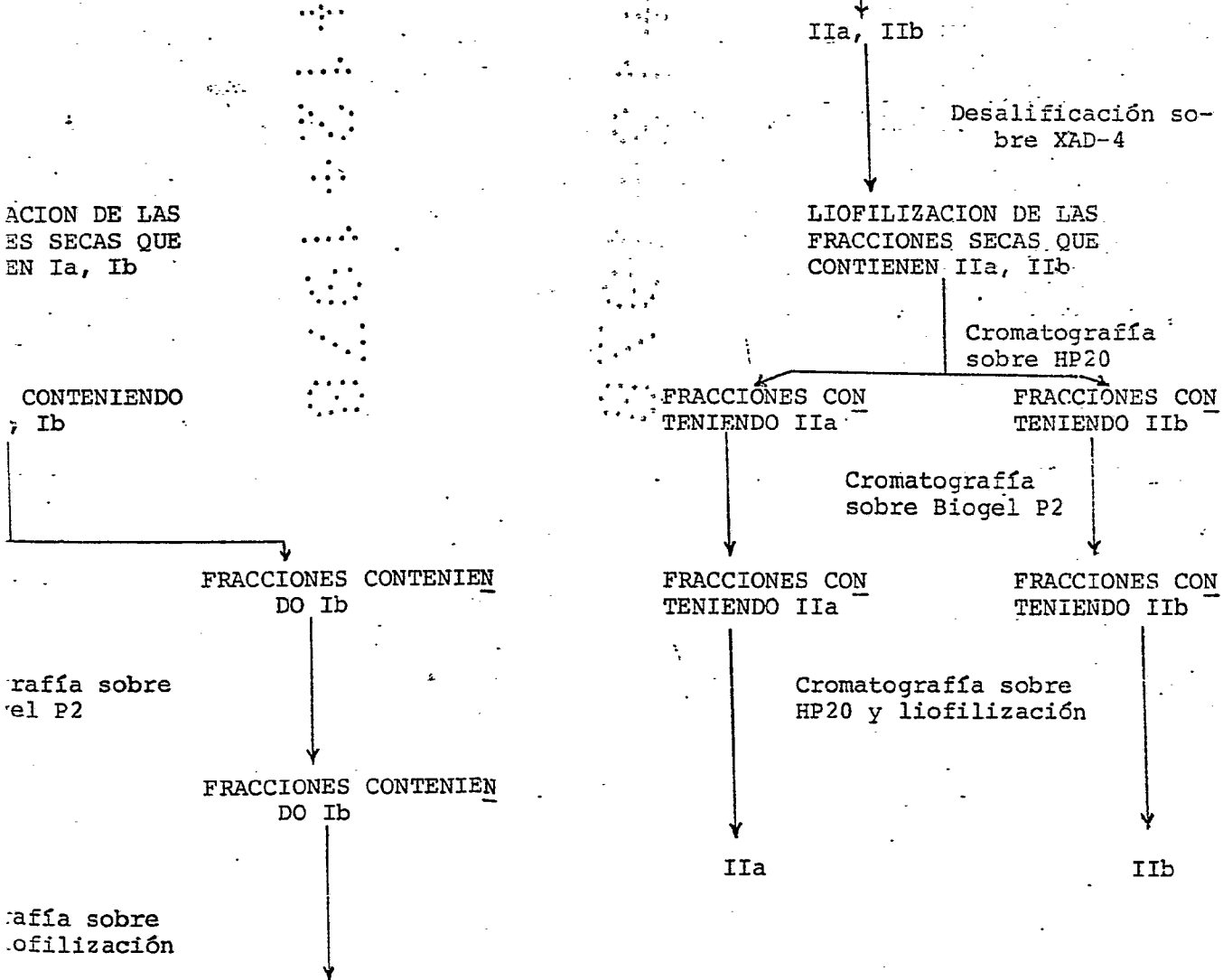
Eluir con NaCl 0,2M en tampón

↓  
COMBINAR LAS FRACCIONES QUE  
CONTIENEN Ia, Ib, IIa y IIb

Desalificar sobre XAD-4  
Eluir con isopropanol/agua

↓  
EVAPORACION A PRESION REDUCIDA  
PARA SEPARAR EL PROPANOL

Cromatografía sobre QAE Sephadex



1 (En este ejemplo, la referencia a los compuestos (Ia), (IIa),  
(Ib) y (IIb) se refiere a sus sales sódicas).

Se preparan esporas de Streptomyces olivaceus ATCC  
31365 esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 14.

5 Se utiliza la suspensión de esporas de un frasco Roux  
como inoculum para 75 litros de medio de siembra esterilizado  
contenidos en un fermentador de acero inoxidable de 100 li-  
tros, provisto de tabiques. La composición del medio es:

10

Harina de soja (Arkasoy 50)	1 %
Glucosa	2 %
Antiespumante Pluronic L81	0,03 %

preparado en agua destilada.

El medio se esteriliza a vapor en el fermentador du-  
rante 20 minutos a 120°C. El cultivo de siembra se agita a  
15 140 rpm con un agitador de paletas de 7,5" (19 cm) y se intro-  
duce aire estéril a 75 litros/minuto (a través de un rociador  
de extremo abierto). La temperatura se controla a 28° y des-  
pués de incubar durante 48 horas se agregan 75 litros del cul-  
tivo de siembra como inoculum a 1500 litros de un medio de  
20 fermentación mantenido en un fermentador de acero inoxidable  
de 200 litros totalmente tabicado.

La composición del medio de fermentación es:

25

Harina de soja (Arkasoy 50)	2,0 %
Glucosa	0,9 %
Greda	0,02 %
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0001 %
Antiespumante Pluronic L81	0,2 %

(Medio preparado en agua destilada y pH ajustado a  
30 6,0 antes de la esterilización).

La fermentación se agita con dos propulsores de turbi-

1 na de 19" (48 cm) de diámetro a 106 rpm y se hace pasar aire a un caudal de 400 litros/minuto. La temperatura se mantiene a 29°C y el pH a 6,5-7,0. El fermentador se cosecha al cabo de 48 horas.

5 Un nuevo filtrado de cultivo adecuado para la extracción de los compuestos Ia, Ib, IIa y IIb se prepara como sigue:

10 Se utiliza una suspensión de esporas de S. olivaceus, preparada a partir de dos fracos Roux como se ha descrito anteriormente, para inocular 150 litros de un medio de siembra esterilizado contenidos en un fermentador de acero inoxidable de 300 litros totalmente tabicado. El medio y las condiciones de crecimiento de esta fase de siembra son esencialmente los descritos anteriormente. Al cabo de 48 horas se utilizan los 150 litros del medio de siembra para inocular 3000 litros del medio de fermentación contenido en un fermentador de acero inoxidable de 5000 litros totalmente tabicado. La fase de fermentación se prosigue en condiciones esencialmente similares a las descritas anteriormente, a excepción de que la fermentación se cosecha al cabo de 55 horas.

20 El caldo completo de los fermentadores de 2000 litros y 5000 litros, preparado como se ha descrito antes, da un volumen combinado de 4725 litros. El caldo se clarifica por filtración en un filtro a vacío rotatorio previamente recubierto dando los filtrados combinados 4200 litros de caldo clarificado. Este último es percolado a razón de 10 litros/minuto a través de columnas de la resina cambiadora de anión fuertemente básica Amberlite IRA 458 (forma de cloruro). La resina se lava con 60 litros de agua desionizada y después se eluye con 30 una solución acuosa de NaCl 0,2M con fosfato sódico 0,075M,

1 pH 6,7. La elución de Ia, Ib, IIa y IIb comienza cuando la  
conductividad del eluyente ha alcanzado la del NaCl 0,1M y  
han eluido cuando se han recogido 450 litros de eluyente.  
5 Cuando sea necesario, se determina la presencia de Ia, Ib,  
IIa y IIb mediante un sistema analítico de cromatografía de  
líquidos a alta presión basado en el método preparativo des-  
crito en el Ejemplo 21.

10 A los eluatos combinados que contienen Ia, Ib, IIa y  
IIb de la columna de IRA 458 se añade Amberlite XAD-4 (90 kg  
de peso húmedo). La mezcla se ajusta a pH 6,0 empleando áci-  
do clorhídrico al 50 % y se agita suavemente a 5°C durante  
una hora. Después la resina se separa por filtración y se la-  
va con agua desionizada a 5°C hasta que la conductividad de  
15 las aguas de lavado es menor que la de una solución 0,05M  
de NaCl. La resina lavada se suspende en 42 litros de isopro-  
panol/agua 1:1 y se añade NaOH al 20 % en peso/volumen hasta  
un pH constante de 7,5. El eluyente se separa por filtración  
y se conserva. La elución de la resina se repite con una nue-  
va cantidad de isopropanol/agua 1:1 y finalmente se repite  
20 el proceso empleando isopropanol/agua 1:3. Se combinan los  
eluatos (130 litros) y se evaporan a presión reducida para  
separar el isopropanol. La solución resultante (67 litros)  
es percolada a razón de 15 litros/hora sobre una columna de  
QAE Sephadex A25 (15 x 43 cm) previamente equilibrada en  
25 NaCl 0,1M. La columna se lava con 7,5 litros de NaCl 0,05M  
y se eluye con NaCl 0,1M a razón de 7,8 litros/hora, recogién-  
dose fracciones de 500 ml. En las fracciones se determina la  
presencia de Ia, Ib, IIa y IIb por cromatografía de líquidos  
a alta presión. Se combinan las fracciones que contienen Ia  
30 y Ib, que eluyen juntas (12,6 litros) y también se combinan

1 las que contienen IIa y IIb que eluyen más tarde (5,9 litros).

5 A las fracciones combinadas conteniendo Ia y Ib se añaden 44,16 g/l de NaCl. La solución resultante es percolada a 5,8 litros/hora a través de una columna de Amberlite XAD-4 (10 x 36 cm). La columna se lava con 3 litros de agua desionizada a razón de 2,9 litros/hora y después se eluye con isopropanol/agua 1:9. Se recoge el eluyente que contiene Ia y/o Ib en proporciones adecuadas, determinadas por cromatografía de líquidos a alta presión, después de que la conductividad del eluyente ha descendido a un nivel equivalente al del NaCl 0,01M. La solución de eluato (7,7 litros) que contiene Ia y Ib se ajusta a pH 7,0 empleando NaOH al 20 % en peso/volumen, se concentra a presión reducida y se liofiliza para dar 38,5 g de un sólido.

15 Los eluatos combinados de la columna de QAE Sephadex A25 conteniendo los compuestos IIa y IIb se tratan de forma similar para obtener 13,7 g de un sólido.

20 El producto liofilizado (38,5 g) de la columna de XAD-4, que contiene los compuestos Ia y Ib, se disuelve en 50 ml de agua desionizada y se aplica a una columna de QAE Sephadex A25 (7,8 x 30 cm) preparada en agua desionizada. La columna se lava con 4 litros de NaCl 0,05M y después se eluye con NaCl 0,08M; en ambos casos a razón de 8 ml/minuto. Se recogen fracciones de aproximadamente 20 ml desde el principio de la elución. En las fracciones se determina el espectro ultravioleta y se combinan las que presentan un espectro que concuerda con el de los compuestos Ia y Ib (130-170 (950 ml). La cromatografía en QAE Sephadex se realiza a 5°C.

25  
30 A 450 ml de las fracciones combinadas que contienen Ia y Ib, procedentes de la cromatografía en QAE Sephadex, se

1 añaden 23,8 g de NaCl. La solución resultante se aplica a  
una columna de Diaion HP20 (4,8 x 62 cm) (Mitsubishi Chemi-  
cals Ltd., Agents Nippon Rensui Co., Fuji Bldg., 2-3 Marunou-  
5 chi, 3-Chome, Chiyoda-Ku, Tokyo 100, Japón) a razón de 12 ml/  
minuto y se recogen fracciones de 20 ml aproximadamente. Se  
determina el espectro ultravioleta de las fracciones y se com-  
binan independientemente las que contienen Ia (58-74) y Ib  
(78-97), se concentran por evaporación a presión reducida y  
se liofilizan para dar respectivamente 490 mg y 357 mg de  
10 sólido.

Los eluatos combinados residuales de la columna de  
QAE que contienen los compuestos Ia y Ib se procesan de for-  
ma similar para dar 363 mg y 258 mg de un sólido que contiene  
respectivamente Ia y Ib.

15 Se disuelven 538 mg del sólido que contiene Ia pro-  
cedente del procedimiento anterior en 25 ml de agua desioni-  
zada y se aplica a una columna de Biogel P2 (200-400 mallas)  
(7,8 x 40 cm). La columna se eluye con agua desionizada a  
3 ml/minuto y se recogen fracciones de 25 ml. La cromatografía  
20 se realiza a 5°C. Se determina el espectro ultravioleta de  
las fracciones y se combinan las que presentan el espectro ca-  
racterístico del compuesto Ia altamente purificado (37-42).  
Las fracciones combinadas se concentran por evaporación a  
presión reducida hasta 10 ml aproximadamente. La solución re-  
sultante se aplica a una columna de Diaion HP20 (calidad cro-  
matográfica) de 3,0 x 50 cm. La columna se eluye con agua  
25 desionizada a 5 ml/minuto y se recogen fracciones de 10 ml.  
Se determina el espectro ultravioleta de las fracciones y se  
combinan las que tienen un espectro característico del compues-  
to Ia altamente purificado (50-62), se concentran a presión  
30

1 reducida y se liofilizan para dar 40 mg de Ia sólido.

5 Se disuelven 5,8 mg del sólido que contiene el compuesto Ib, procedente de la cromatografía en HP20, en aproximadamente 25 ml de agua desionizada y la solución resultante se aplica a una columna de Biogel P2 de 7,8 x 40 cm. La columna se eluye con agua desionizada a razón de 3ml/min. y se recogen fracciones de 25 ml. Se combinan las fracciones que contienen Ib altamente purificado (32-37) a juzgar por su espectro ultravioleta. Las fracciones combinadas se evaporan a presión reducida hasta 10 ml aproximadamente y la solución resultante se aplica a una columna de 2,4 x 40 cm de Diaion HP20 (calidad cromatográfica). La columna se eluye con agua desionizada a 5 ml/minuto y se recogen fracciones de 10 ml. Se determina el espectro ultravioleta de las fracciones y las que contienen Ib altamente purificado (35-48) se combinan y liofilizan para dar 53 mg de Ib sólido.

15 En 50 ml de agua desionizada se disuelven 7 g del sólido liofilizado procedente de la etapa de desalificación con XAD-4, que contiene los compuestos IIa y IIb y se aplica a una columna de Diaion HP20 de 4,8 x 57 cm. La columna se eluye con agua desionizada a razón de 10 ml/minuto y se recogen fracciones de 20 ml aproximadamente. En las fracciones se determina el espectro ultravioleta y las que contienen IIa (49-63) y IIb (71-110) se combinan independientemente y se liofilizan para dar respectivamente 875 mg y 1,47 g de sólido.

20 El sólido residual de IIa y IIb procedente de la columna XAD-4 se procesa de forma similar para dar respectivamente 860 mg y 1,44 g de IIa y IIb sólidos.

25 Se disuelven 860 mg del compuesto IIa antes preparado

30

1 en 25 ml de agua desionizada y se aplica a una columna de  
Biogel P2 (200-400 mallas) de 7,8 x 40 cm. La columna se  
eluye con agua desionizada a 3 ml/minuto y se recogen frac-  
ciones de 25 ml. Se combinan las fracciones que contienen  
5 el compuesto IIa altamente purificado, a juzgar por su espec-  
tro ultravioleta (42-50). Las fracciones combinadas se con-  
centran a 10 ml aproximadamente por evaporación a presión  
reducida y se cargan en una columna de 2,8 x 40 cm de Diaion  
HP20 (calidad cromatográfica). La columna se eluye con agua  
10 desionizada, se determina el espectro ultravioleta de las  
fracciones y se combinan las que presentan un espectro carac-  
terístico del compuesto IIa altamente purificado (52-64). Las  
fracciones combinadas se concentran por evaporación y se lio-  
filizan para dar 95 mg de IIa sólido.

15 Se disuelven 750 mg del compuesto IIb preparado ante-  
riormente en unos 25 ml de agua desionizada y se aplican a  
una columna de Biogel P2 (200-400 mallas) de 7,8 x 40 cm. La  
columna se eluye con agua desionizada a 3 ml/minuto y se re-  
cogen fracciones de 25 ml. Se combinan las fracciones que con-  
20 tienen IIb altamente purificado (47-55), a juzgar por su es-  
pectro ultravioleta. Las fracciones combinadas se evaporan a  
presión reducida hasta 10 ml aproximadamente y esta solución  
se carga en una columna de 2,8 x 42 cm de Diaion HP20 (cali-  
dad cromatográfica). La columna se eluye con agua desioniza-  
25 da a 5 ml/minuto. Las 25 primeras fracciones se recogen como  
fracciones de 5 ml y las restantes como fracciones de 10 ml.  
Se determina el espectro ultravioleta de las fracciones y se  
combinan las que contienen compuesto IIb altamente purificado  
30 (77-91) y se liofilizan para dar 105 mg de IIb sólido.

EJEMPLO 24

Propiedades de las sales sódicas de los compuestos de fórmulas Ia, Ib, IIa y IIb

Los materiales preparados esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 23 y sustancialmente puros tienen las siguientes propiedades:

(1) Espectro UV

Ia: máximo único a 298 nm (extinción molar  $\epsilon = 8131$ ) (véase Figura 1)

Ib: máximo único a 301 nm (extinción molar  $\epsilon = 7930$ ) (véase Figura 2)

IIa: dos máximos a 228 y 308-309 nm ( $\epsilon = 13.627$ ) (véase Figura 3)

IIb: dos máximos a 229 y 308-310 nm ( $\epsilon = 13.933$ ) (véase Figura 4)

(2) La actividad antibacteriana de las sales sódicas determinada por el método de microvaloración se encuentra en la Tabla A.

(3) La actividad inhibidora de la  $\beta$ -lactamasa de las sales sódicas se encuentra en la Tabla B.

(4) Espectro de RMN

Ia: Véase la Figura 5 para el espectro en  $D_2O$

Ib: Véase la Figura 6 para el espectro en  $D_2O$

IIa: Véase la Figura 7 para el espectro en  $D_2O$

IIb: Véase la Figura 8 para el espectro en  $D_2O$ .

(5) La actividad sinérgica de las sales sódicas se encuentra en la Tabla C.

(6) Las sales sódicas no producen ningún efecto tóxico evidente en ratones cuando se administran subcutáneamente en solución acuosa a razón de 50 mg/kg.



1

TABLA B

I<sub>50</sub> (µg/ml)

5

<u>Compuesto</u>	<u>Enterobacter P99</u>	<u>Ps. aeruginosa A</u>	<u>Proteus C889</u>	<u>E. coli JT4</u>	<u>Staph. Russell</u>
IIa	0,02	3,0	0,04	>2,0	0,08
IIb	0,04	4,0	0,4	0,1	>2,0
Ia	0,02	4,0	0,1	>2,0	3,25
Ib	0,04	4,0	<2,0	0,28	>2,0

10

TABLA C

CMI (µg/ml)

15

<u>Compuesto</u>	<u>Staph. aureus Russell</u>	<u>E. coli JT39</u>
Ampicilina sola	1000	2000
+ (Ia) 0,1 µg/ml	>10	>500
1 µg/ml	-	500
+ (Ib) 0,1 µg/ml	>10	500
1 µg/ml	10	31,2
+ (IIa) 0,1 µg/ml	10	>500
1 µg/ml	-	500
+ (IIb) 0,1 µg/ml	>10	500
1 µg/ml	10	31,2

20

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

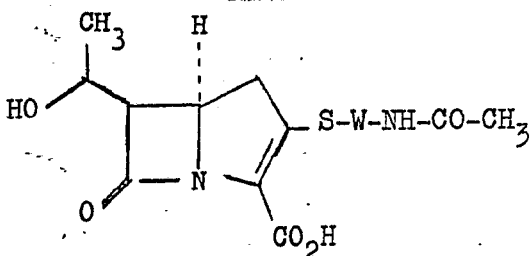
25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de nuevos derivados del 1-azabicyclo {3,2,0} hept-2-en-2-carboxílico de fórmula:

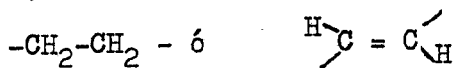
30

1



5

donde W representa un dirradical de fórmula:



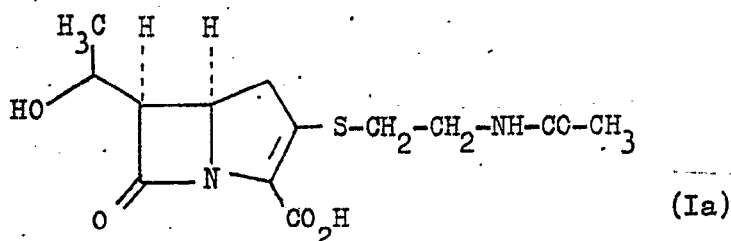
10

o una sal de los mismos; cuyo procedimiento comprende cultivar una cepa productora de Streptomyces olivaceus o Treptomyces gaddenensis hasta que se ha producido una cantidad sustancial de dicho compuesto del medio de cultivo, y, si se desea, someter una mezcla de las sales obtenidas a separación cromatográfica sobre Diaion HP 20 o sobre una resina cromatográficamente equivalente.

15

2. Un procedimiento según la reivindicación 1 donde la fórmula del compuesto obtenido es

20

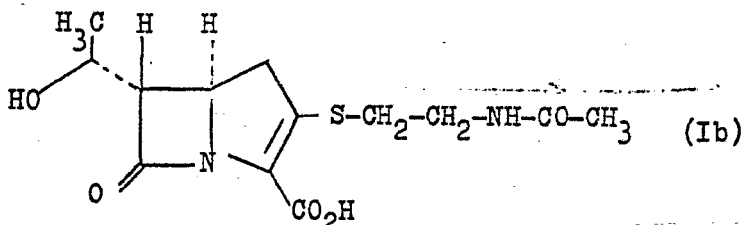


25

o una sal del mismo.

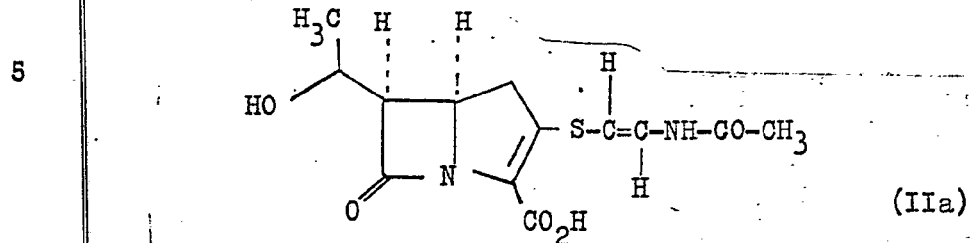
3. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde la fórmula del compuesto obtenido es

30



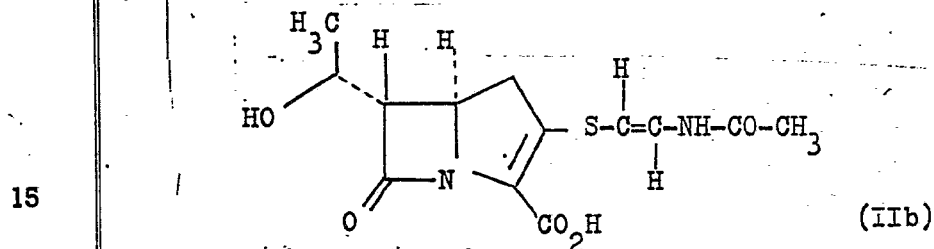
1 o una sal del mismo.

4. Un procedimiento según la reivindicación 1 donde la fórmula del compuesto obtenido es:



o una sal del mismo.

10 5. Un procedimiento según la reivindicación 1 donde la fórmula del compuesto obtenido es:



o una sal del mismo.

20 6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el compuesto obtenido es una sal farmacéuticamente aceptable.

7. Un procedimiento según la reivindicación 6, donde el compuesto obtenido es una sal metálica alcalina o alcalino-térrea.

25 8. Un procedimiento según la reivindicación 7, donde la sal es una sal sódica.

9. Un procedimiento según la reivindicación 7 donde la sal es una sal potásica.

30 10. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 donde la sal tiene una pureza del 50% como mínimo.

1 11. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 donde la sal tiene una pureza del 75 % como mínimo.

5 12. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 donde la sal tiene una pureza del 90 % como mínimo.

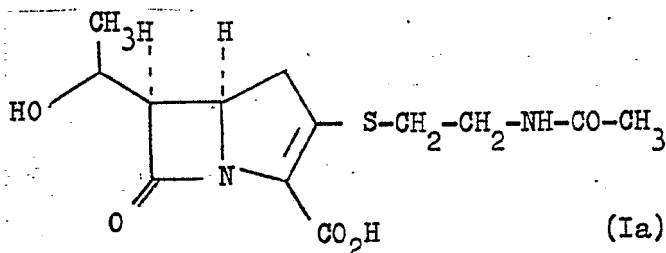
10 13. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 donde el compuesto obtenido es una sal del compuesto de fórmula (Ia), exenta de cualquier sal del compuesto de fórmula (Ib).

14. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 donde el compuesto obtenido es una sal del compuesto de fórmula (Ib) exenta de cualquier sal del compuesto de fórmula (Ia).

15 15. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 donde el compuesto obtenido es una sal del compuesto de fórmula (IIa) exenta de cualquier sal del compuesto de fórmula (IIb).

20 16. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 donde el compuesto obtenido es una sal del compuesto de fórmula (IIb) exenta de cualquier sal del compuesto de fórmula (IIa).

25 17. Un procedimiento según la reivindicación 6 donde el compuesto obtenido es una sal metálica alcalina del compuesto de fórmula (Ia):

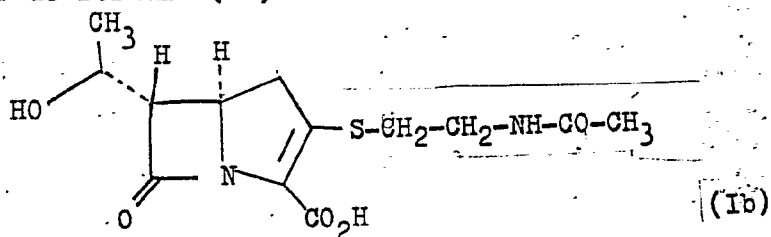


1 cuya sal metálica alcalina presenta un coeficiente de extinción molar no inferior a 7700 cuando se disuelve en agua a pH neutro.

5 18. Un procedimiento según la reivindicación 17, donde el coeficiente de extinción molar es no inferior a 7900 cuando se disuelve en agua a pH neutro.

19. Un procedimiento según las reivindicaciones 17 o 18, donde la sal es una sal sódica.

10 20. Un procedimiento según la reivindicación 6 donde el compuesto obtenido es una sal metálica alcalina del compuesto de fórmula (Ib):

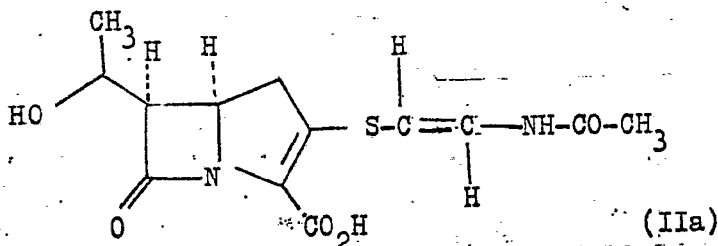


cuya sal metálica alcalina presenta un coeficiente de extinción molar no inferior a 7700 cuando se disuelve en agua a pH neutro.

20 21. Un procedimiento según la reivindicación 20, donde el coeficiente de extinción molar es no inferior a 7900 cuando se disuelve en agua a pH neutro.

22. Un procedimiento según las reivindicaciones 20 ó 21, donde la sal es una sal sódica.

25 23. Un procedimiento según la reivindicación 6 donde el compuesto obtenido es sal metálica alcalina del compuesto de fórmula (IIa):

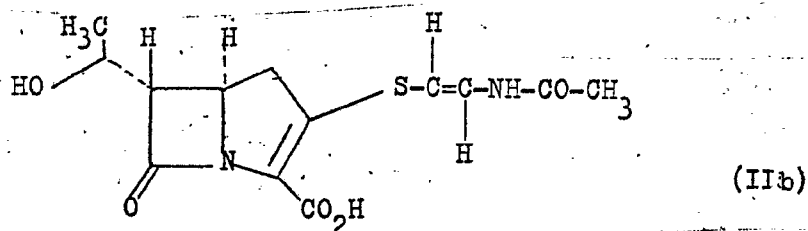


1       cuya sal alcalina presenta un coeficiente de extinción mo-  
lar no inferior a 13.000, cuando se disuelve en agua a pH  
neutro.

5       24. Un procedimiento según la reivindicación 20,  
donde el coeficiente de extinción molar es no inferior a  
13.500 cuando se disuelve en agua a pH neutro.

25. Un procedimiento según las reivindicaciones 23  
ó 24, donde la sal es una sal sódica.

10       26. Un procedimiento según la reivindicación 6 don-  
de el compuesto obtenido es una sal metálica alcalina del  
compuesto de fórmula (IIb):



20       cuya sal metálica alcalina presenta un coeficiente de extin-  
ción molar no inferior a 13.000 cuando se disuelve en agua  
a pH neutro.

27. Un procedimiento según la reivindicación 20,  
donde el coeficiente de extinción molar es no inferior a  
13.500 cuando se disuelve en agua a pH neutro.

25       28. Un procedimiento según las reivindicaciones 23  
ó 24, donde la sal es una sal sódica.

29. Un procedimiento según la reivindicación 1, don-  
de se utiliza Streptomyces olivaceus ATCC 31126 o un mutante  
del mismo de gran rendimiento.

30       30. Un procedimiento según la reivindicación 1 don-  
de se utiliza Streptomyces olivaceus ATCC 31365 o un mutante

1 del mismo de gran rendimiento.

5 31. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde se obtiene una sal del compuesto de fórmula (Ia) esencialmente exenta del compuesto de fórmula (Ib), porque se somete la mezcla de dichas sales a separación cromatográfica sobre Diaion HP20 o sobre una resina cromatográficamente equivalente.

10 32. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde se obtiene una sal del compuesto de fórmula (Ib) esencialmente exenta del compuesto de fórmula (Ia), porque se somete la mezcla de dichas sales a separación cromatográfica sobre Diaion HP20 o sobre una resina cromatográficamente equivalente.

15 33. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde se obtiene una sal del compuesto de fórmula (IIa) esencialmente exenta de un compuesto de fórmula (IIb), porque se somete la mezcla de dichas sales a separación cromatográfica sobre Diaion HP20 o sobre una resina cromatográficamente equivalente.

20 34. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde se obtiene una sal del compuesto de fórmula (IIb) esencialmente exenta del compuesto de fórmula (IIa), porque se somete la mezcla de dichas sales a separación cromatográfica sobre Diaion HP20 o sobre una resina cromatográficamente equivalente.

25 35. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, donde la sal es una sal metálica alcalina.

30 36. Un procedimiento según la reivindicación 35, donde la sal metálica alcalina es la sal sódica.

1 37. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 36, donde el disolvente empleado es agua.

38. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:

5 UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS DERIVADOS DE 1-AZABICICLO{3.2.0} HEPT-2-EN-2-CARBOXILICO.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria Descriptiva que consta de sesenta y cuatro páginas mecanografiadas.

10 Madrid, 3 de Marzo de 1978

BERNARDO UNGRIA

P.D.



15

20

25

30