

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

NUMERO	472701
FECHA DE PRESENTACION	18-8-78

AH



ESPAÑA

20 ENE. 1979

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO 825,883	32 FECHA 19-8-77	33 PAIS Estados Unidos
---	---------------------	---------------------------

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION

UN METODO PARA LA PREPARACION DE TIENAMICINA.

71 SOLICITANTE (S)

MERCK & CO., INC.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065 - EE.UU.

72 INVENTOR (ES)

Jean S. Kahan y Frederick M. Kahan, de nacionalidad estadounidense.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

POOR QUALITY

1

El enzima penicilin amidohidrolasa, de origen bacteriano o fúngico, se utiliza a escala industrial para catalizar la separación hidrolítica de la cadena lateral de la penicilina para dar el núcleo ácido 6-amino penicilánico (6-APA). Este núcleo es el material de partida para la síntesis de penicilinas de amplio espectro (semi-sintéticas) que se preparan por acilación del grupo amino.

5

10

La International Commission of Enzyme Nomenclature ha dado a la enzima el nombre sistemático de penicilin amidohidrolasa (E.C. 3.5.1.11).

15

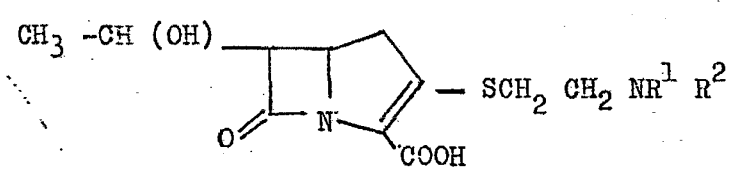
Un nuevo antibiótico es la tienamicina (Patente Estadounidense Nº 3.950.357). Las directrices de la Patente nº 3.950.357 se incorporan aquí como referencia. Los N-acil derivados de tienamicina se rompen inesperadamente por penicilin amidohidrolasa.

RESUMEN DE LA INVENCION :

La presente invención proporciona un nuevo procedimiento para la conversión de N-aciltienamicinas en tienamicina.

20

Según la presente invención, una N-acil-tienamicina, que tiene la siguiente estructura:

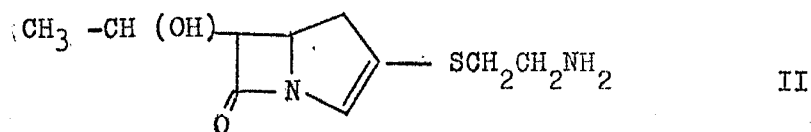


25

donde R¹ y R² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno (R¹ y R² no son ambos hidrógeno) o un grupo acilo, se pone en contacto en un medio acuoso con enzimas que son capaces de separar la fracción N-acilo para formar la tienamicina.

30

La tienamicina tiene la estructura:



5 La tienamicina es un valioso antibiótico que es activo tanto frente a bacterias gram-positivas como gram-negativas.

Más particularmente, los enzimas utilizados para separar la fracción N-acilo son penicilin amidohidrolasas.

10 Los compuestos preferidos de esta invención son aquellos en los que R¹ es hidrógeno y R² es acilo. Por término "acilo" se entiende los ácidos carboxílicos alifáticos y aromáticos incluyendo derivados y análogos de los mismos tales como tio-análogos donde el oxígeno del carbonilo está reemplazado por azufre, radicales diacilo en los que R¹ y R² van unidos juntamente; así como los análogos de acilo de azufre y fósforo tales como radicales sulfonilo, sulfinilo y sulfenilo sustituidos, y radicales de P(III) y P(V) sustituidos tales como radicales fosforoso, fosfórico, fosfonoso y fosfónico sustituidos, respectivamente. Dichos radicales acilo de la presente invención se definen después.

15

20

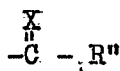
MEMORIA DESCRIPTIVA DE LA INVENCION

25 Los N-acil derivados pueden prepararse por cualquiera de las técnicas conocidas en la especialidad, si la tienamicina se ha aislado de la solución o caldo de fermentación. Si la tienamicina no se ha aislado del caldo de fermentación, entonces el método de preparación de la N-acil-tienamicina es por reacción del acilcompuesto apropiado mientras la tienamicina está aún en el caldo

30 o solución. Alternativamente el grupo acilo puede incor-

1 porarse biosintéticamente a continuación de suplementar
el caldo de fermentación con el ácido principal o un de-
rivado del mismo. Estos derivados, en virtud de una ma-
y 5 yor solubilidad en disolventes orgánicos y propiedades
físicas adicionales, proporcionan caminos alternativos
y más eficaces para recuperación del núcleo de tienamici-
na. Una vez que la tienamicina derivada se recupera del
caldo o solución, puede tratarse por los métodos descri-
tos en esta invención con objeto de regenerar la tienami-
cina.

10 En la representación general de los compuestos de
la presente invención (I, anterior), el radical acilo R¹
o R² puede, entre otros, ser un radical alifático sustitui-
do o no sustituido, un radical aromático o heterocíclico,
un radical de ácido carboxílico aralifático o heterociclil-
15 alifático, un radical carbamilo sustituido o no sustituido
o un radical de ácido carbótico. Uno de los grupos de
radicales acilo puede representarse por la fórmula gene-
ral:



20 donde X es O o S y R'' representa un alquilo de cadena rec-
ta o ramificada o un grupo alcoximetileno que contiene de
5-10 átomos de carbono, ariloximetileno, que comprende
típicamente 6-10 átomos de carbono. Estos grupos antes se-
ñalados pueden ser no sustituidos o pueden estar sustitui-
dos por radicales tales como OH, SH, SR (R es alquilo in-
25 ferier o un arilo tal como fenilo), grupos alquilo o al-
coxilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, halo, tal
como Cl, Br, F y I, ciano, carboxilo, sulfamino, carbamo-
ilo, sulfonilo, azido, amino, amino sustituido tal como
alquilemino incluyendo amonio cuaternario en el que el
30 grupo alquilo comprende 1-6 átomos de carbono, haloalqui-
lo tal como trifluorometilo, carboxialquilo, carbamoilal-

1 quilo, carbamoilalquilo N-sustituido, donde la fracción
alquilo de los cuatro radicales anteriores comprende de 1
a aproximadamente 6 átomos de carbono, amidino, guanidino,
guanidino N-sustituido, alquil(inferior) guanidino y si-
5 milares. Entre los ejemplos representativos que pueden
mencionarse de tales grupos acilo están aquellos en los
que R" es bencilo, fenoximetileno, p-hidroxibencilo,
n-amilo, n-heptilo, 3- o 4-nitrobencilo, fenetilo, α -dife-
niletilo, metildifenilmetilo, trifenilmetilo, 2-metoxi-
fenilo, 2,6-dimetoxifenilo, 2,4,6-trimetoxifenilo, D-4-N-
10 benzoilamino-4-carboxi-n-butilo, p-aminobencilo, o-amino-
bencilo, m-aminobencilo, p-dimetilaminobencilo, 2-etoxi-
1-naftilo, 4-guanidinometilfenilo, 4-guanidinometilben-
cilo, 4-guanidinobencilo, 4-guanidinofenilo, 2,6-dime-
toxi-4-guanidino, o-sulfobencilo, p-carboximetilbencilo,
15 p-carbamoilmetilbencilo, m-fluorobencilo, m-bromobencilo,
p-clorobencilo, p-metoxibencilo, 1-naftilmetilo, 2-fenil-
vinilo, 2-feniletinilo, fenilo, o-metoxifenilo, o-cloro-
fenilo, o-fenilfenilo y p-aminometilbencilo.

Los compuestos preferidos que pueden utilizarse
en esta invención que encajan en la descripción de los
20 radicales anteriores son fenilacetilo, p-hidroxifenil-
acetilo, fenilglicilo, 2-tienilacetilo, fenoxiacetilo,
N-propoxiacetilo e iso-butoxiacetilo.

El empleo de penicilin amidohidrolasas para con-
vertir penicilinas en ácido 6-aminopenicilánico (6-APA)
ya se conoce en la especialidad. Sin embargo, es sorpren-
25 dente el empleo de penicilinamidohidrolasas para separar
las cadenas laterales de N-acilo de tienamicina N-acila-
da. El procedimiento de esta invención puede llevarse a
cabo por reacción del material de partida de fórmula ge-
neral I con el extracto del enzima de un caldo de culti-

30

1 vo, el filtrado o producto de fermentación del cultivo
de Escherichia coli o un polvo del enzima en solución a-
cucosa. Alternativamente, el enzima puede inmovilizarse
5 por adsorción o reacción química en una estructura sopor-
te insoluble tal como vidrio, celulosa o agar, y utilizar-
se para hidrolizar la tienamicina N-acilada bien por
contacto en suspensión, o por percolación del material
acilado a través de un lecho de la preparación enzimática
inmovilizada.

10 El enzima es capaz de separar las fracciones de
N-acilo que están presentes o se producen en los caldos
de fermentación así como aquellos grupos N-acilo intro-
ducidos durante el aislamiento del antibiótico o se hacen
por síntesis química.

15 Más particularmente, la desacilación de tienamici-
na N-acilada tiene lugar en presencia de un enzima del
microorganismo del género Escherichia coli que es capaz
de separar la fracción acilo para proporcionar el anti-
biótico tienamicina.

20 Para la producción del enzima amidohidrolasa por
cultivo del microorganismo antes mencionado, pueden em-
plearse diversos medios de cultivo, empleados comunmen-
te para el cultivo de un microorganismo. Más especifica-
mente, pueden emplearse glucosa, sucrosa, glicerina, al-
midón, los aceites utilizados para cultivos y similares
como fuente de carbono y peptona, caldo, licor de macera-
25 ción de maiz, extracto de levadura, extracto de levadu-
ra, extracto de carne, harina de pescado, soja desengra-
sada, germen de trigo y similares como fuente de nitró-
geno. Si se necesita, se pueden emplear otros aditivos
en combinación con los anteriores. Es una ventaja, aun-
que no es necesario, incluir ácido fenilacético o sus
30

1 sales o derivados en medios de fermentación.

En un método de cultivo, el Escherichia coli se sacude o agita normalmente bajo aireación. La temperatura de cultivo puede variar entre aproximadamente 23-27 °C.
5 El periodo de cultivo es normalmente entre 20-28 horas.

La amidohidrolasa contenida en el caldo de cultivo o su extracto puede utilizarse en el presente procedimiento sin ninguna purificación posterior. El enzima amidohidrolasa puede precipitarse con disolventes apropiados, salinificarse o dializarse o purificarse de otra forma.
10 Se le puede utilizar libre en solución o inmovilizado sobre una superficie apropiada.

Un método utilizado en la presente invención es aquel que emplea la preparación de amidohidrolasa del total de las células. Por este método, después del cultivo,
15 se centrifuga el cultivo para obtener el total de las células para reaccionar subsiguientemente con la tienamicina derivada.

Lo siguiente se da únicamente con propósito de ilustración no constituyendo en ningún modo una limitación al marco de la invención.
20

EJEMPLO 1

Cincuenta ml de extracto de levadura al 2,5 % que contiene ácido fenilacético neutralizado (con NaOH), 0,08 %, en un matraz Erlenmeyer de 250 ml se inoculan con un tubo de cultivo liofilizado de MB-2929 (Escherichia coli N.C.I. B. 8743). Este matraz se agita a 25 °C a 240 rpm durante
25 24 horas. Una porción de 35 ml se centrifuga a 7500 rpm durante 15 minutos. Se descarga el sobrenadante y se vuelve a suspender la masa en 18 ml de agua destilada. Se centrifuga la solución a 7500 rpm durante 15 minutos. Se des-

30

1 carga el sobrenadante y la masa se recoge en 1 ml de tampon de fosfato de potasio 0,05M, pH 7,4, para dar una preparaci3n de amidohidrolasa con el total de c3lulas, que entonces se almacena a 0 9C.

5 Se incuban 18 horas a 23 9C las siguientes mezclas de reacci3n:

1. Una porci3n de 10- μ l de la preparaci3n de amidohidrolasa con el total de c3lulas m3s 30 μ l de una soluci3n de N-fenilacetil tienamicina de aproximadamente 400- μ g/ml.
- 10 2. Una porci3n de 10 μ l de tampon fosfato de potasio 0,05M, pH 7,4, m3s 30 μ l de una soluci3n de N-fenilacetil tienamicina de aproximadamente 400- μ g/ml.
- 15 3. Una porci3n de 10- μ l de la preparaci3n de amidohidrolasa con el total de c3lulas m3s 30 μ l de una soluci3n de N-(0-formil)-1-mandeloil tienamicina de aprox. 1,3-mg/ml.
- 20 4. Una porci3n de 10- μ l de un tampon de fosfato pot3sico 0,05M, pH 7,4, m3s 30 μ l de una soluci3n de N-(0-formil)-1-mandeloil tienamicina de aproximadamente 1,3 mg/ml.
5. Una porci3n de 10- μ l de tampon fosfato de potasio 0,05M, pH 7,4, m3s 30 ml de una soluci3n de tienamicina de 1-mg/ml.

25 Despues de 18 horas de incubaci3n, se aplican partes al3cuotas de las mezclas de reacci3n de 1- μ l a una placa TLC recubierta de celulosa, revelando con EtOH:H₂O 70:30. Despues de secar al aire, la placa TLC se coloca sobre una placa de ensayo de Staphylococcus aureus ATCC 6538P durante cinco minutos.

30 Las placas de ensayo se preparan como sigue:

1 Se diluye el producto del desarrollo durante la noche del
organismo de ensayo, Staphylococcus aureus ATCC 6538P, en
caldo nutriente más 0,2 % de extracto de levadura, con
5 caldo nutriente más 0,2 % de extracto de levadura a una
suspensión que tiene 60 % de transmitancia a una longitud
de onda de 660 nm. Esta suspensión se añade a agar nutrien
te Difco suplementado con 2,0 g/l de extracto de levadu-
ra Difco, entre 47 °C y 48 °C, para formar una composición
que contiene 33,2 ml de la suspensión por litro de agar.
10 Se vierten cuarenta ml de esta suspensión en placas petri
de 22,5 cm x 22,5 cm, y estas placas se enfrían y se man-
tienen a 4 °C hasta que se utilicen (5 días como máximo).

Se separa la placa TLC y se incuba la placa de
ensayo durante la noche a 37 °C.

Se observan las siguientes manchas bioactivas:

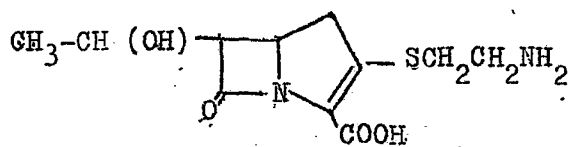
- 15
1. R_f 0,45 y 0,81;
 2. R_f 0,82;
 3. R_f 0,39 y 0,78;
 4. R_f 0,76
 5. R_f 0,39 - 0,45

20 Las manchas bioactivas adicionales presentes en
 R_f 0,39 y R_f 0,45 en las mezclas de reacción tratadas con
enzima que contienen fenilacetiltienamicina y N-(O-formil)
mandeloil tienamicina se deben a la tienamicina produci-
da por la reacción con el enzima amidohidrolasa. Un con-
25 trol que sólo contiene tampon y enzima no produce man-
chas bioactivas.

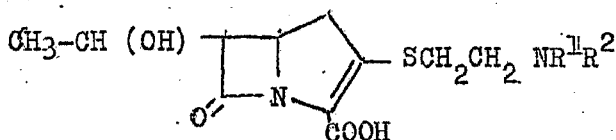
1 En resumen, la Patente de Invención que se solici-
cita deberá recaer sobre las siguientes

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para la preparación de tienamicina
que tiene la estructura:



10 que comprende poner en contacto un compuesto que tiene la
fórmula:



15 donde R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del gru-
po que consiste en hidrógeno y radical acilo, no siendo
 R_1 y R_2 los dos hidrógeno, con una penicilin amidohidro-
lasa.

2. Un procedimiento, según la reivindicación 1,
donde el radical acilo está representado por la fórmula:



20 donde X es O o S y R'' representa alquilo de cadena recta
o ramificada o alcoximetileno que contiene entre 5-10 áto-
mos de carbono; tioalquilo, tioarilo de 6-10 átomos de
25 carbono; ariloximetileno que contiene de 6-10 átomos
de carbono.

3. Un procedimiento, según la reivindicación 1,
donde el radical acilo se selecciona del grupo que consis-
te en fenacetilo, p-hidroxifenilacetilo, fenilglicilo,
2-tienilacetilo, fenoxiacetilo, N-propoxiacetilo e iso-

1 butoxiacetilo.

4. Un procedimiento según la reivindicación 1 donde la penicilin amidohidrolasa es 3.5.1.11 de Escherichia coli, N.C.I.B. 8743.

5 5. Un procedimiento, según la reivindicación 4, donde la separación enzimática se lleva a cabo en medio acuoso.

6. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita por: UN METODO PARA LA PREPARACION DE TIENAMICINA.

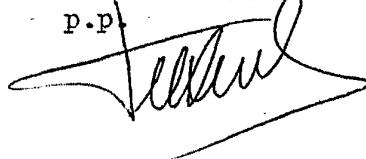
10 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de once páginas mecanografiadas.

15

Madrid, 18 de Agosto 1.978

BERNARDO UNGRIA

P.P.



20

25

30