



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

221003
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 35/00

(22) Prihlášené 14 09 81
(21) (PV 6762-81)

(40) Zverejnené 15 09 82

(45) Vydané 15 03 86

(75)
Autor vynálezu

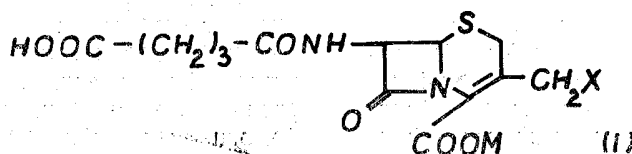
SOMOROVÁ MARTA ing., MAZÁŇ ŠTEFAN RNDr., DUDEK MARCEL ing.,
WELWARD LADISLAV ing. CSc., BANSKÁ BYSTRICA, MARTVOŇ
AUGUSTÍN doc. ing. CSc., KOŠALKO RUDOLF ing. CSc., BRATISLAVA,
CHROMÍK JINDŘICH ing. CSc., PRAHA, FRIMM RICHARD doc. ing. CSc.,
BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy 7-(4-karboxybutanamido)-3-cefemderivátov

1

2

Vynález sa týka spôsobu prípravy 7-(4-karboxybutanamido)-3-cefem derivátov o-
becného vzorca I

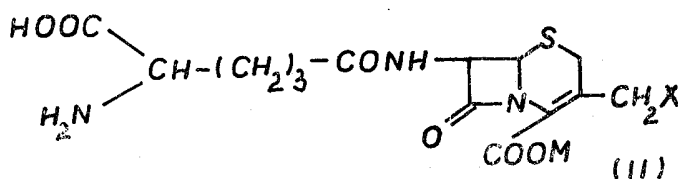


kde

X je vodíkový atóm, hydroxylová skupina, acétoxy skupina, 5-karboxymetyltio-1,3,4-tiadiazol-2-yl skupina, 1-metyl-1H-tetrazol-5-yl skupina, alebo 5-metyl-1,3,4-tiadiazol-2-yl skupina,

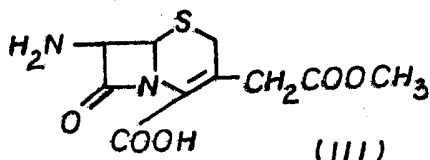
M je vodíkový atóm alebo kation tvoriaci soli a komplexy.

Zlúčeniny obecného vzorca I je možné pripraviť zo 7-(D-5-amino-5-karboxy-n-valer-amido)-3-cefem derivátov obecného vzorca II s rovnakým významom substituentov X a M ako u zlúčenín obecného vzorca I.



Zlúčeniny obecného vzorca I je možné chemicky alebo účinkom acyláz rôznych mikroorganizmov transformovať N-dezacylá-

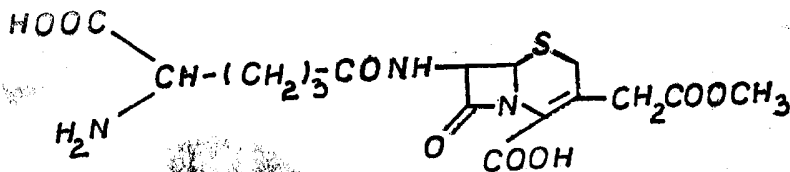
ciou na kyselinu 7-amino-3-acetoxymetyl-3-cefem-4-karboxylovú (kyselina 7-aminocetofalosporánová — vzorec III).



(III)

Kyselina 7-aminocefalosporánová je východiskovou surovinou pri príprave polosyntetických cefalosporínových antibiotík. V súčasnosti je pripravovaná prednostne chemickou konverziou sodnej soli alebo zinočnaté-

ho komplexu 7-(D-5-amino-5-karboxy-n-valeramido)-3-acetoxymetyl-3-cefem-4 karboxylovej kyseliny [cefalosporín C — vzorec IV].



(IV)

Nedostatkom chemických metód prípravy kyseliny 7-aminocefalosporánovej je surovinová náročnosť, prísny technologický režim, práca s agresívnymi látkami a viacstupňový proces. Perspektívnou sa javí enzýmová dezacylácia zlúčenín obecného vzorca II v jednom alebo dvoch stupňoch.

Priamu jednostupňovú N-dezacyláciu polohy C-7 rieši US patent 3 239 394, ktorý uvádza ako producenta cefalosporín-acyláz rody *Brevibacterium*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*. NSR patent 2 723 463 popisuje neekonomickú konverziu cefalosporínu C na kyselinu 7-aminocefalosporánovú (5%), pomocou rodov *Alternaria* a *Aspergillus*.

Japonský patent 7 894 093 chráni bunky *Pseudomonas* sp. BN 188 (FERM-P-3567), ktoré transformujú 1 g cefalosporínu C na 0,12 g kyseliny 7-aminocefalosporánovej.

Perspektívnym sa javí dvojstupňový proces, kde v prvom stupni sú účinkom D-aminoacidoxidázy (D-aminoacid : O₂-oxidoreduktáza -deamiujúca) transformované zlúčeniny obecného vzorca II, na zlúčeniny obecného vzorca I, ktoré sú v druhom stupni deacylované acylázami baktérií a húb na kyselinu 7-aminocefalosporánovú.

Riešením enzýmovej N-deacylácie zlúčenín vzorca I sa zaoberá patent NSR 2 355 078, ako producent acyláz je uvádzaný kmeň *Arthrobacter* CA-218; v japonskom patente producentom acyláz je *Alcaligenes* CA-4887; japonský patent 5 394 093 uvádza ako producenta acyláz *Pseudomonas ovalis* ATCC 950 a japonský patent 7 670 884 popisuje bunky *Comamonas* sp.

V časopiseckej literatúre existujú informácie, že látky obecného vzorca I boli detekované aj v kultivačných pôdach niektorých kmeňov patriacich k rodu *Cephalosporium* [J. Ferment. Technol. 54, 10, 1976, s. 712].

Medzi producentami D-aminoacidoxidáz sú uvádzané rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Aerobacter* (Belgický patent 736 934) a kvasinka *Trigonopsis variabilis*

(Japonský patent 507 158). Japonský patent 7 644 695 chráni D-aminoacidoxidázu produkovanú *Fusarium solani*.

Japonský patent 80 023 966 ako producenta D-aminoacidoxidázy uvádza kmeň *Candida humicola* IFO-0753, ktorý rovnakým mechanizmom pôsobí aj na cefamycíny.

Brodelius P. v Enzyme Eng. 5, 1980, s. 383 popisuje prípravu α -ketokyselín pomocou D-aminoacidoxidázy produkovanej imobilizovanými bunkami *Trigonopsis variabilis*.

V práci Serizawu a Nakagawu [J. Antibiotics XXXIII, 6, 1980, s. 585] je rozpracované pôsobenie D-aminoacidoxidázy z kvasinky *Trigonopsis variabilis* SANK 59 963 (IAM-4443) na cefamycíny.

Kmeň *Trigonopsis variabilis* IFO 0755 chráni rakúsky patent 355 204.

Väčšina vypracovaných postupov používa ako substrát pre deaminačnú reakciu čisté soli cefalosporínu C. V prípadoch, kde používajú fermentačnú pôdu, resp. filtrát — čo predstavuje najekonomickejší postup — je doporučovaný významný prebytok D-aminoacidoxidázy [jap. patent 507 158].

Riešenie predstavuje jednak získanie buniek s vyššou aktivitou D-aminoacidoxidázy, alebo úprava fermentačnej pôdy pred enzýmovou reakciou.

Podstata vynálezu spočíva v spôsobe prípravy 7-(4-karboxybutánamido)-3-cefem derivátov obecného vzorca I enzýmovou konverziou 7-(D-amino-5-karboxy-n-valeramido)-3-cefem derivátov obecného vzorca II pôsobením vysoko aktívnych buniek kvasinky *Trigonopsis variabilis* CCY 15-1-1 (Chemický ústav akademie ved, československá sbierka kvasinkovitých mikroorganizmov, Bratislava).

Vysokoaktívne bunky *Trigonopsis variabilis* sú získané aerobnou kultiváciou v prítomnosti induktorov. Ako účinný induktor je možné použiť sodnú soľ kyseliny 7-(D-5-amino-5-karboxy-n-valeramido)-3-acetoxymetyl-3-cefem-4-karboxylovej (cefalosporín C) v množstve 1 až 7 mmol/l s optimom 5

mmol/l alebo kyselinu DL- α -aminoadipovú o koncentrácii 1 až 5 mmol/l, s optimom 3 mmol/l. V prítomnosti uvedených induktorov sú získané bunky vyznačujúce sa vysokou aktivitou D-aminoacidoxidázy, vhodné aj na enzýmovú konverziu fermentačnej pôdy, ktorá obsahuje cefalosporín C.

Získané vysokoaktívne bunky sú ďalej spracované organickými rozpúšťadlami, účinkom nízkych teplôt, alebo vzájomnou kombináciou obidvoch postupov. Na enzýmovú oxidáciu sa používajú zlúčeniny obecného vzorca II vo forme solí alebo ako voľné kyseliny prítomné vo fermentačnej pôde.

Bunky kvasinky *Trigonopsis variabilis* sa pripravujú dvojstupňovou kultiváciou. V prvom stupni sa používa pôda o zložení: kukuričný extrakt 2 %, glukóza 2 %, pepton 1 %. V druhom stupni sa používa pôda o zložení: kukuričný extrakt 2 %, glukóza 3 %, pepton 1 %, kašalotový olej 1 % 5 mmol/l sodnej soli cefalosporínu C alebo 3 mmol/l kyseliny DL- α -aminoadipovej.

Obidve pôdy sú rozplnené po 60 ml v 500 mililitrových bankách. pH pôdy pred sterilizáciou je 5,0. Kultivácia obidvoch stupňov trvá 72 hodín pri teplote 27 °C, na trepacom stroji (4 Hz, excenter 0,04m). Po skončení kultivácie sa bunky separujú na odstredivke pri 4 °C, 3000xg, 10 minút. Bunky sa premývajú 0,15 mol/l NaCl s obsahom 0,1% detergentu [Tween-20, Triton X-100]. Premyté bunky sa uskladňujú pri -10 až -30 °C. K uvoľneniu D-aminoacidoxidázy dochádza už pôsobením nízkych teplôt s nasledujúcim rozsuspenderovaním buniek v roztokoch fosfátových pufrů (0,1 mol/l), pH 6,5 až 8,5.

Účinným spôsobom uvoľnenia enzýmu je tiež inkubácia buniek s chloroformom, toluénom, alebo vzájomnou kombináciou oboch postupov. Pri enzýmovej konverzii zo sodnej soli alebo draselnej soli cefalosporínu C sú používané koncentrácie 20 až 100 mmol/l. V prípade, že sa používa fermentačná pôda, je možné pracovať s deproteinizovaným filtrátom, získaným úpravou pH fermentačnej pôdy, alebo upraviť pôdu pomocou neionogenných sorbentov (Amberlit XAD-2, Diaion HP-20). pH enzýmovej reakcie je v intervale 6,5 až 8,5 s optimom pri pH 8,1. Teplota enzýmovej reakcie z aspektu stability cefalosporínov je v intervale 28 až 40 °C, s optimom pri 33 °C. V preparátoch D-aminoacidoxidázy je obvykle prítomná kataláza. Ako inhibítory katalázy sú používané: kyselina askorbavá, 3-amino-1,2,3-triazol a anorganické azidy, najmä azid sodný (1 až 100 mmol/).

Enzýmová reakcia je stimulovaná prítomnosťou Mn^{2+} iónov, ktoré zvyšujú reakčnú rýchlosť a chránia koncový produkt pred degradáciou. Oxidatívnu deaminačnú reakciu stimuluje tiež detergent Triton X-100 v koncentráciách 0,01 až 0,3 %, s optimom 0,1 %.

Enzýmová reakcia vyžaduje prítomnosť O_2 . Aerácia je zabezpečená väčšinou v pomere 1 objem vzduchu/l objem zmesi/min.

Enzýmová reakcia vyžaduje v závislosti na podmienkach 2 až 6 hodinový reakčný čas. Priebeh enzýmovej konverzie je možné sledovať metódou chromatografie na tenkej vrstve (TLC), alebo vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou (HPLCH), kde je možné proces jednoducho kvantifikovať.

Metóda TLC

10 μ l filtrátu reakčnej zmesi naniesť na platne silikagelu Silikagel 60 F 254 Merck, alebo Silufol UV-254 (Kavalier). Zostupne vyvíjať v systéme n-butanol : kyselina octová : voda : (4 : 1 : 2). Vysušené platne detekovať pod UV svetlom (254 nm). Zlúčeniny obecného vzorca I a II sa prejavujú ako tmavé zóny. Po postriekaní ninhydrínom dávajú ninhydrín-pozitívnu reakciu len látky obecného vzorca II.

Metóda HPLCH

Chromatograf Spectra Physics SP-8000. Ako mobilná fáza použitý 0,01 mol/l NaH_2PO_4 v 10% metanole; prietok mobilnej fázy 1 ml/min. Ako náplň kolóny použitá reverzná fáza oktadecylsilan RP-18 (Merck).

Za uvedených podmienok bolo dosiahnuté dobré rozlíšenie látok obecného vzorca I a II. Zlúčeniny vzorca I je možné po skončení enzýmovej reakcie izolovať po filtrácii pri pH 2,5 extrakciou do octanu etylatého. Z organickej fázy možno tieto látky získať buď ako voľné kyseliny, alebo ako soli s niektorými amínmi [N,N' -dibenzyletyléndiamín], alebo s morfolínom.

Príklad 1

Bunky *Trigonopsis variabilis* získané v dvojstupňovej kultivácii na pôde s obsahom 5 mmol/l sodnej soli cefalosporínu C boli separované na odstredivke pri 4 °C, 3000xg, 10 minút. Bunky boli premyté dvakrát 50 ml 0,15 mol/l NaCl s obsahom 0,1% Tweenu-20 a deponované pri -20 °C.

10 g buniek po rozmrazení sa rozsuspenderuje v 100 ml 0,1 mol fosfátového pufru 8,1; ako inhibítory kataláz sa použije 1 mmol azidu sodného; substrátom je 8 mol sodnej soli cefalosporínu C. Enzýmová konverzia prebieha pri 33 °C za miešania a vzdušenia 4 hodiny. Priebeh konverzie bol sledovaný kvapalinovou chromatografiou v hodinových intervaloch. Stupeň konverzie 80 %.

Príklad 2

Postup zhodný s príkladom 1, ale namiesto sodnej soli cefalosporínu C bola ako induktor použitá kyselina DL- α -aminoadipová v množstve 3 mmol/l.

Príklad 3

Bunky *Trigonopsis variabilis* pripravené

za rovnakých kultivačných podmienok ako v príklade 1.

Po premytí buniek 0,15 mol/l NaCl s obsahom 0,1 % Tween-20 sa 10 g buniek suspenduje v 100 ml 0,1 mol/l fosfátového pufru pH 8,1. K suspenzii sa pridá 10 ml toluénu. Aktivácia enzýmu prebiehala 3 hodiny pri teplote 27 °C za miešania (4 Hz). Po aktivácii sa bunky separujú z toluénovej zmesi na odstredivke pri 4 °C, 3000xg, 10 minút a použijú na konverziu podľa príkladu 1.

Príklad 4

Bunky *Trigonopsis variabilis* so pripraví za rovnakých kultivačných podmienok ako v príklade 1. Po premytí sa deponujú pri -30 °C. 10 g zmrazených buniek sa rozsuspenderuje v 100 ml toluénovej zmesi (toluén: Tween-20 = 49 : 1). Aktivácia buniek bola zhodná s príkladom 3. Po aktivácii sa bunky separujú na odstredivke pri 4 °C, 3000xg, 10 minút, premyjú roztokom 0,15 mol/l NaCl ako v bode 1 a použijú na konverziu v pomeroch uvedených v príklade 1. Stupeň konverzie 83 %.

Príklad 5

10 g buniek pripravených podľa príkladu 2 deponovaných pri -30 °C sa aktivuje ako v príklade 4 s tým rozdielom, že po aktivácii sa použije priamo 20 ml toluénovej buncenej suspenzie, pridá sa 1,6 mmol sodnej soli cefalosporínu C a 0,2 mmol/ azidu sodného. Ďalší priebeh zhodný s príkladom 1.

Príklad 6

Postup prípravy buniek zhodný s príkladom 3, ale ako aktivačnú zmes sa použije 100 ml fosfátového pufru a 10 ml chloroformu.

Príklad 7

Bunky sa pripraví a aktivujú ako v príklade 4. Na enzýmovú konverziu sa použije filtrát fermentačnej pôdy upravený acidifikáciu pôdy na pH 2,5 a po filtrácii späťne upravený na pH 8,0. Na 100 ml filtrátu sa použije 10 g aktivovaných buniek v prítomnosti 10 mmol azidu sodného. Konverzia prebiehala pri 33 °C na trepacom stroji (4,6 Hz) 4 hodiny.

Príklad 8

10 g buniek kultivovaných za prítomnosti sodnej soli cefalosporínu C, deponovaných pri -30 °C, sa pridá k 100 ml filtrátu fermentačnej pôdy upravenej neionogenným sorbentom Diaion HP-20. K reakčnej zmesi

sa pridá 5 ml toluénu a 10 mmol azidu sodného. pH zmesi sa upraví na 8,0. Konverzia za miešania a vzdušenia (1 objem vzduchu/1 objem zmesi) trvala pri teplote 33 °C 5 hodín.

Príklad 9

Postup zhodný s príkladom 8, ale na úpravu pôdy sa použije Amberlit XAD-2.

Príklad 10

Konverzia sa realizuje podľa príkladov 1 až 6. Zmes po konverzii (500 ml) sa prefiltruje. pH filtrátu sa upraví na 2,5, zopakuje sa filtrácia. Previede sa trojnásobná extrakcia filtrátu octanom etylnatým. Etylacetátové extrakty sa vysuší síranom sodným, nakoncentrujú vo vákuu pri teplote max. 35 °C. Zo zahusteného extraktu pri 5 °C kryštalizuje kyselina 7-(4-karboxybutánamido)-cefalosporánová. Z matečných lúhov je možné kvantitatívne izolovať zvyšky uvedenej kyseliny prídavkom n-hexánu. Totožnosť kyseliny identifikovaná metódou HPLCH.

Príklad 11

Postup zhodný s príkladom 10 až po získanie vysušeného etylacetátového extraktu, ku ktorému sa po kvapkách pridáva 5%-ný roztok N,N'-dibenzyletyléndiamínu v octane etylnatom (v molárnom pomere k vzniknutej kyseline 7-(4-karboxybutánamido)cefalosporánovej.

Dochádza ku kvantitatívnemu zrážaniu uvedenej kyseliny vo forme žltej zrazeniny, identita ktorej bola zistená metódou HPLCH.

Príklad 12

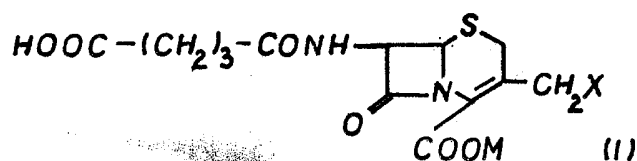
Postup zhodný s príkladom 10 až po získanie etylacetátového extraktu, ktorý sa vákuove nakoncentruje približne na 1/5 pôvodného objemu. K získanému koncentrátu sa za intenzívneho miešania pridáva po kvapkách morfolín. Vzniknutá morfolínová soľ kyseliny 7-(4-karboxybutánamido)cefalosporánovej je bledej farby.

Príklad 13

Postupuje sa podľa príkladu 7, tj. použije sa filtrát fermentačnej pôdy. Po skončení enzýmovej konverzie sa zmes prefiltruje a pridá sa 10 % Amberlitu XAD-2, po dôkladnom premiešaní sa sorbent odfiltruje, pH filtrátu sa upraví na 2,5; zopakuje sa filtrácia, vzniknutý číry filtrát sa spracuje etylacetátom, etylacetátová vrstva sa spracováva postupom podľa príkladu 10, 11, alebo 12.

PREDMET VYNÁLEZU

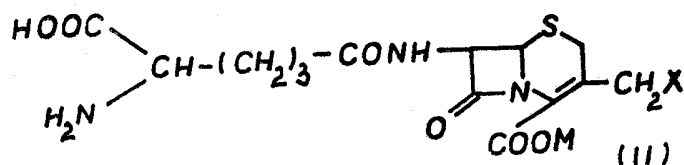
Spôsob prípravy 7-(4-karboxybutanamido)-3-cefem derivátov obecného vzorca I



kde

X je vodíkový atóm, hydroxylová skupina, acetoxyskupina, 5-karboxymetyltio-1,3,4-tiadiazol-2-yl skupina, 1-metyl-1H-tetrazol-5-yl skupina, alebo 5-metyl-1,3,4-tiadiazol-2-yl skupina a

M je vodíkový atóm alebo kation tvoriaci soli a komplexy vyznačujúci sa tým, že na 7-(D-5-amino-5-karboxy-n-valeramido)-3-cefem deriváty obecného vzorca II



s rovnakým významom substituentov X a M ako u zlúčenín obecného vzorca I sa pôsobí vysokoaktívnymi bunkami mikroorganizmu

Trigonopsis variabilis CCY-15-1-1 za aerobných podmienok.