



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 12.10.76 (P. 192968)

Pierwszeństwo: 13.10.75 Wielka Brytania

Zgłoszenie ogłoszono: 01.08.77

Opis patentowy opublikowano: 15.01.1981

Int. Cl.²

C07D 498/04
//A61K 31/42



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Beecham Group Limited, Brentford (Wielka Brytania)

Sposób wytwarzania soli kwasu klawulanowego

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania soli kwasu klawulanowego na drodze fermentacji *Streptomyces jumonjinensis*.

Kwas klawulanowy o wzorze 1, który jest użytecznym związkiem o działaniu przeciwbakteryjnym, oraz jego sole i estry opisane są w belgijskim opisie patentowym nr 827926.

W opisie tym przedstawiony jest również sposób wytwarzania kwasu klawulanowego i jego pochodnych na drodze fermentacji *Streptomyces clavuligerus*.

Streptomyces jumonjinensis opisany jest w belgijskim opisie patentowym nr 804341 jako szczep bakteryjny wytwarzający czynnik przeciwbakteryjny inny niż kwas klawulanowy. Obecnie stwierdzono, że w trakcie hodowania *Streptomyces jumonjinensis* powstaje również kwas klawulanowy.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania soli kwasu klawulanowego o wzorze 1, który polega na tym, że hoduje się szczep *Streptomyces jumonjinensis* a następnie usuwa się komórki ze środowiska fermentacyjnego, kontaktuje się sklarowaną brzoeczkę przy pH=6—7 ze słabo lub silnie zasadową żywicą jonowymienną do momentu aż żywica zostanie nasycona kwasem klawulanowym, wymywa się żywicę wodnym roztworem soli, rozdziela się frakcje wykazujące aktywność inhibitorów β -laktamazy, wysala się te frakcje i wyodrębnia sól kwasu klawulanowego.

Kwas klawulanowy odzyskuje się w postaci sta-

2

łych soli litu, sodu, potasu wapnia, magnezu, baru, glinu, amonu lub podstawionych soli amonu, takich jak pierwszo, drugo, trzecio- i czwartorzędowe sole amonowe.

Korzystnie kwas klawulanowy odzyskiwany jest w postaci stałej soli metalu alkalicznego, takiej jak sól sodowa lub potasowa.

Termin „stałe sole kwasu klawulanowego” oznacza w opisie krystaliczne i bezpostaciowe sole kwasu klawulanowego. Sole kwasu klawulanowego korzystnie jest uzyskiwać w postaci krystalicznej, na przykład jako krystaliczną, czterowodną sól sodową kwasu klawulanowego lub jako krystaliczną sól potasową lub sodową.

W sposobie według wynalazku korzystnie jest stosować *Streptomyces jumonjinensis* NRRL 5741 lub jego wysoko wydajny mutant.

Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741 zdeponowany jest w Baarn w Holandii jako CBS 177.76 i w German Collection of Microorganisms DSN.

Używany w opisie termin „hodowanie” oznacza umyślny rozwój w warunkach aerobowych organizmu wytwarzającego kwas klawulanowy w obecności przyswajalnych źródeł węgla, azotu i soli mineralnych. Rozwój taki może mieć miejsce w stałym lub półpłynnym środowisku odżywczym, lub w środowisku ciekłym, w którym odżywki są rozpuszczone lub zdyspergowane. Hodowanie może być prowadzone w warunkach aerobowego lub całkowitego zalania. Środowisko odżywcze może

być utworzone ze złożonych odżywek, lub może być zdefiniowane chemicznie.

W belgijskim opisie patentowym nr 804,341 przedstawione są ogólne warunki hodowania *Streptomyces jumonjinensis*.

Jak stwierdzono, szczególnie przydatne są środowiska zawierające takie złożone odżywki jak ekstrakt drożdżowy, mączka sojowa itp.

Środowisko odżywcze, które może być stosowane do hodowania *Streptomyces jumonjinensis* może zawierać w granicach 0,1–10% złożone, organiczne źródło azotu, takie jak ekstrakt drożdżowy, wodny roztwór merceryzowanej kukurydzy, białko roślinne, białko nasienne, produkty hydrolizy takich białek, hydrolizaty białka pochodzącego z mleka, ekstrakty ryb i mięsa, i hydrolizaty takie jak peptony. Jako chemicznie zdefiniowane źródła azotu można stosować mocznik, sole amonowe, amidy, zwykle aminokwasy takie jak walina, asparagina, kwas glutaminowy, prolina i fenyloalanina, lub ich mieszaniny. Do środowiska odżywczego mogą być włączone węglowodory w ilości 0,1–5%. Można stosować również skrobię lub produkty jej hydrolizy takie jak dekstryna, sacharoza, laktoza lub inne cukry, lub glicerynę lub estry gliceryny. Źródłami węgla mogą być oleje roślinne lub tłuszcze zwierzęce. Do środowiska odżywczego mogą być również włączone kwasy karboksylowe i ich sole, jako źródło węgla dla wzrostu i wytwarzania inhibitorów β -laktamazy.

Niezbędne może być dodanie środków przeciwpianujących takich jak Pluronic L81, w celu regulowania pienienia niektórych środowisk w kadziach fermentacyjnych.

Do opisanego wyżej środowiska, zwłaszcza jeśli jest zdefiniowane chemicznie, można dodać soli mineralnych takich jak NaCl, KCl, MgCl₂, ZNCl₂, FeCl₃, Na₂SO₄, FESO₄, MgSO₄ i soli Na⁺ i K⁺ kwasu fosforowego. CaCO₃ można dodać jako źródło jonów Ca⁺⁺ lub dla jego działania buforującego.

Można włączyć również śladowe ilości soli takich pierwiastków jak nikiel, kobalt lub mangan. W razie potrzeby można dodać witamin.

Stosowany w opisie termin „mutant” oznacza dowolny mutant szczepu pojawiający się samorzutnie lub w wyniku działania czynnika zewnętrznego, bez względu na to, czy czynnik taki stosowany jest umyślnie czy przypadkowo. Odpowiednie sposoby tworzenia mutantów obejmują również sposoby opisane w belgijskim opisie patentowym nr 827,926.

Hodowanie *Streptomyces jumonjinensis* prowadzi się normalnie w temperaturze w granicach 16–35°C, zwykle w granicach 20–32°C, a korzystnie w granicach 25–30°C, na przykład w temperaturze około 27°C, i przy pH w granicach 5–8,5, a korzystnie w granicach 6–7,5.

Streptomyces jumonjinensis może być hodowany w takim środowisku umieszczonym w zwykłych naczyniach, na przykład w szklanych kolbach stożkowych napowietrzanych przez wstrząsanie, na przykład na wstrząsarce obrotowej, lub w napowietrzanych kadziach fermentacyjnych, na przykład w zaopatrzonych w przegrody kadziach fermentacyjnych wykonanych z nierdzewnej stali

i mieszanych przy pomocy wirnika zaopatrzonego w tarczę z łopatkami, a napowietrzanych przez urządzenie rozpryskujące. Fermentację można również prowadzić w sposób ciągły.

Wyjściowe pH środowiska poddawane fermentacji wynosi zwykle 7,0, a maksymalną wydajność kwasu klawulanowego uzyskuje się w okresie 1–10 dni hodowli w temperaturze 20–32°C, na przykład w okresie 2–5 dni.

Kwas klawulanowy jak i jego sole mogą być ekstrahowane z przesączu hodowli różnymi sposobami opisanymi w belgijskim opisie patentowym nr 827,926. Jak stwierdzono, szczególnie użyteczne są sposoby polegające na ekstrahowaniu rozpuszczalnikami zimnego przesączu hodowli o kwasowych wartościach pH, oraz metody oparte na anionowym charakterze tego produktu przemiany materii, takie jak zastosowanie anionitów organicznych.

Zwykle przed ekstrakcją usuwa się ze środowiska hodowli na drodze filtracji lub odwirowania komórki *Streptomyces jumonjinensis*.

W procesie ekstrakcji rozpuszczalnikiem przesącz hodowli schładza się, obniża jego pH do zakresu pH=2–3 przez dodanie kwasu, po czym dokładnie miesza z nie mieszającym się z wodą rozpuszczalnikiem organicznym takim jak octan n-butyli, metyloizobutyloketon, n-butanol lub octan etylu. Do obniżenia pH środowiska stosuje się zwykle kwas nieorganiczny taki jak kwas chlorowodorowy, siarkowy, azotowy, fosforowy itp., natomiast do ekstrakcji zakwaszonego przesączu hodowli szczególnie przydatny jest n-butanol. Po rozdzieleniu faz na drodze odwirowania, kwas klawulanowy będący produktem przemiany materii wspomnianego szczepu ekstrahuje się z warstwy rozpuszczalnika wodnym roztworem kwaśnego węglanu sodowego lub buforem wodorofosforanu potasowego, zawieszoną CaCO₃ lub wodą, utrzymując pH mieszaniny w granicach odczynu obojętnego, na przykład przy pH = 7,0. Wyciąg wodny, po rozdzieleniu faz, można zatężyć pod zmniejszonym ciśnieniem i liofilizować w celu uzyskania surowego osadu soli kwasu klawulanowego. Uzyskany produkt jest trwały w przypadku przechowywania go w temperaturze –20°C, w postaci wysuszonej substancji stałej.

W procesie z użyciem anionitu organicznego, obojętny lub lekko kwaśny przesącz hodowli, na przykład o pH = 6–7, wprowadza się w kontakt ze złożem anionitów organicznego o charakterze słabej lub mocnej zasady, odpowiednio takiego jak Amberlite IR₄B lub Zerolit FFIP, aż do całkowitego nasycenia żywicy, co objawia się obecnością kwasu klawulanowego w wycieku ze złoża. Wówczas złożo przemywa się wodą i eluuje wodnym roztworem soli takiej jak chlorek metalu alkalicznego, na przykład chlorek sodowy. Frakcje zawierające kwas klawulanowy łączy się, wysala i liofilizuje, uzyskując surowy osad soli kwasu klawulanowego. Amberlite IR₄B jest przykładem anionitu organicznego o charakterze słabej zasady, z aktywnymi grupami poliaminowymi i usieciowanym podłożem polistyrenowo-dwuwinylowo-benzenowym. Innymi, nadającymi się do tego celu anionitami

organicznymi są Amberlite IRA68 i IRA93. Zerolit FFIP jest anionitem organicznym o charakterze mocnej zasady, posiadającym aktywne, czwartorzędowe grupy amonowe i usieciowane podłoże poliwinylowo-dwuwinyllobenzenowe. Żywice równoważne Zerolitowi FFIP to Isopor FFIP oraz DeAcidite FFIP SRA 64, 61 i 62.

Alternatywną postacią procesu ekstrakcji jest sposób polegający na zetknięciu przesączu hodowli (zwykle o odczynie zbliżonym do obojętnego) zawierającej sól kwasu klawulanowego z warstwą organiczną, w której rozpuszczona jest nierozpuszczalna w wodzie amina. Odpowiednimi do tego celu rozpuszczalnikami organicznymi są takie typowe, nie mieszające się z wodą rozpuszczalniki polarne jak metyloizobuty — loketon, trójchloroetylen itp. a odpowiednimi aminami są aminy drugorzędowe lub trzeciorzędowe, w których jednym z podstawników jest grupa będąca długim łańcuchem alifatycznym o 12—16 atomach węgla, a drugim III-rz. grupa alkilowa, dzięki czemu cząsteczka jest lipofilowa. W naszym przypadku korzystną aminą okazał się Amberlite LA2. Zwykle aminę stosuje się w postaci soli addycyjnej z kwasem. Po ekstrakcji, kwas klawulanowy znajduje się w warstwie organicznej w postaci soli aminowej. Następnie warstwę organiczną oddziela się od przesączu hodowli. Z warstwy organicznej kwas klawulanowy można ekstrahować wodnym roztworem soli metalu alkalicznego, takiej jak chlorek sodowy, azotan sodowy itp. Surowy osad soli kwasu klawulanowego można uzyskać na drodze liofilizowania lub w podobny sposób.

Do innych sposobów wydzielania kwasu klawulanowego można zaliczyć adsorpcję na węglu, strącanie, wysalanie i filtrację na sitach molekularnych. Sposoby te stosuje się zwykle w połączeniu z innymi metodami wydzielania.

Adsorpcję na węglu można korzystnie prowadzić przepuszczając wodny roztwór hodowli przez złożę węgla drzewnego, na przykład przez kolumnę wypełnioną węglem drzewnym. Następnie warstwę węgla przemywa się korzystnie wodą i eluuje wodnym roztworem mieszającego się z wodą rozpuszczalnika, takiego jak keton, na przykład aceton, zbierając frakcje zawierające kwas klawulanowy. Często wygodnie jest eluować węgiel najpierw acetonem, a potem roztworem wodnym acetonu.

Często korzystnie jest wytwarzać kwas klawulanowy w postaci soli stosunkowo słabo rozpuszczalnej w wodzie, na przykład w postaci soli litowej. W tym przypadku można stosować metody polegające na wytrącaniu lub wysalaniu. Wytrącanie można prowadzić dodając do wodnego roztworu stosunkowo słabiorozpuszczalnej w wodzie soli kwasu klawulanowego, na przykład klawulanianu litowego, czy nierozpuszczalnego w wodzie rozpuszczalnika organicznego. Proces taki można korzystnie prowadzić kontaktując sól kwasu klawulanowego z solą litową, lub eluując solą litową z kolumny, lub rozpuszczając sole w tym samym roztworze i dodając mieszającego się z wodą rozpuszczalnika do roztworu zawierającego klawulanian litowy.

Klawulanian litowy można uzyskać z jego wod-

nego roztworu w obecności jonowego związku litu, korzystnie soli litowej używanej do utworzenia klawulanianu litowego, zwiększając stężenie jonów litu w roztworze tak, by spowodować znaczne przekroczenie współczynnika rozpuszczalności klawulanianu litowego w danej temperaturze. Ponieważ klawulanian litowy w niższych temperaturach jest słabiej rozpuszczalny, proces korzystnie jest prowadzić w obniżonej temperaturze, na przykład w temperaturze w granicach 0—5°C.

Dalsze uzyskanie surowych osadów uzyskanych opisanymi wyżej metodami można prowadzić w różny sposób, lecz szczególnie korzystne jest stosowanie oczyszczania chromatograficznego w kolumnie jonitowej, zwłaszcza, gdy jako jonit stosuje się Isopor, DeAcidite FFIP SRA64 lub celulozę DEAE. Kolumnę wypełnioną DeAcidite można stopniowo eluować wodnym roztworem soli, takiej jak chlorek sodowy, o stężeniu zmieniającym się od 0 do 0,5 m. Kolumnę wypełnioną celulozą DEAE w 0,01 m buforze fosforanowym o pH = 7 można eluować roztworem soli, zwykle roztworem chlorku metalu alkalicznego, takim jak roztwór NaCl o stężeniu 0—0,2 m NaCl w 0,01 m buforze fosforanowym o pH = 7. Frakcje zawierające substancje aktywne można wykrywać badając aktywność inhibicji β -laktamazy i ich oddziaływania na układ KAG — obie te metody opisane są w belgijskim opisie patentowym nr 827926.

Frakcje zawierające związki aktywne łączy się, zateża pod próżnią do niewielkiej objętości i odsala.

Oddzielanie kwasu klawulanowego i/lub jego soli od substancji zanieczyszczających, zwłaszcza od soli nieorganicznych, prowadzi się adsorbując związki o działaniu przeciwbakteryjnym na żywicę lipofilową, na której nie adsorbują się sole nieorganiczne. Szczególnie użyteczny do tego celu jest kopolimer polistyrenowo-dwuwinyllobenzenowy taki jak Amberlite XAD-4. Pożądaną antybiotyki można wymywać z kolumny wodą lub wodnym roztworem alkanolu, a uzyskany roztwór zateżać przez odparowanie i liofilizować. W wyniku uzyskuje się produkt o większej czystości. Oddzielanie kwasu klawulanowego i/lub jego soli od soli nieorganicznych można również korzystnie prowadzić na drodze chromatograficznej w kolumnie wypełnionej żelą stosowanym do filtracji, na przykład usieciowanym żelą dekstranowym takim jak Sephadex G 15 lub żelą poliamidoakrylowym takim jak Biogel P2.

(Biogel P2, Sephadex G15 i Amberlite XAD-4 dostarczony był przez odpowiednie firmy: Bio Rad, Richmond, USA, Pharmacia Great Britain Ltd, 75 Uxbridge Road, London W. 5., U. K. i Rohm and Haas, Philadelphia, USA).

Odsoloną substancję aktywną można oczyszczać dalej na drodze chromatograficznej, na przykład w kolumnie wypełnionej celulozą, przy użyciu układu rozpuszczalników typu woda — alkohol, na przykład układu butanol:etanol:woda w stosunku 4:1:5 (w % objętościowych).

Odmiany procesu wytwarzania czystego kwasu klawulanowego lub jego soli obejmują uzyskiwanie zanieczyszczonego kwasu klawulanowego lub

jego soli, utworzenie w zwykły sposób estru, oczyszczanie estru, i następnie regenerowanie z niego kwasu klawulanowego lub jego soli. Odpowiednim estrem do wykorzystania w tej odmianie sposobu według wynalazku jest ester benzylowy lub podobny, ulegający wodorolizie ester.

Zanieczyszczony kwas klawulanowy lub jego sól, którą poddaje się oczyszczaniu sposobem według wynalazku, może mieć postać osadu lub roztworu zawierającego również znaczne ilości zanieczyszczeń organicznych lub nieorganicznych.

Kwas klawulanowy lub jego sól można przeprowadzić w ester na drodze opisanych wyżej reakcji estryfikacji. Preferowanym sposobem tworzenia pożądanego estru kwasu klawulanowego jest podanie soli kwasu klawulanowego reakcji z czynnikiem estryfikującym takim jak reaktywny halogenek, ester siarczanowy itp. Reakcje takie prowadzi się często w rozpuszczalniku organicznym o wysokiej stałej dielektrycznej, takim jak dwumetyloformamid, mieszanina dwumetyloformamidu i acetonu, dwumetylosulfotlenek, N-metyloacetamid, sześciometylofosforamid itp.

W razie potrzeby, sól kwasu klawulanowego można rozpuścić w zwykły sposób w rozpuszczalniku lub związać z nośnikiem. Odpowiednimi nośnikami do zastosowania w tym procesie są aniony organiczne o charakterze mocnej zasady, zwłaszcza te, które posiadają budowę makrosiatkową, pozwalającą na użycie układów rozpuszczalników nie zawierających wody. Jak stwierdzono, do tego celu nadaje się Amberlyst A26. Sól kwasu klawulanowego można adsorbować na żywicy bezpośrednio z przesączu hodowli, po czym żywicę dysperguować w dwumetyloformamidzie zawierającym jodek sodowy i bromek benzylu. Alternatywnie, kwas klawulanowy można eluować metodą kolumnową przy użyciu roztworu jodku sodowego w dwumetyloformamidzie lub mieszaninie dwumetyloformamidu i acetonu. Kwas klawulanowy zawarty w wycieku estryfikuje się przez dodanie bromku benzylu.

Zanieczyszczony ester kwasu klawulanowego oczyszcza się zwykle na drodze chromatograficznej. W tym przypadku ester rozpuszcza się w rozpuszczalniku organicznym takim jak octan etylu, chlorek metylenu, chloroform itp. Fazę stałą w procesie oczyszczania chromatograficznego stanowi zwykle żel krzemionkowy lub żel stosowany do filtracji, taki jak Sephadex LH 30 lub podobne pod względem przydatności w chromatografii substancje.

Frakcje wypływające z kolumny można badać na obecność estru kwasu klawulanowego wykorzystując jego własności synergiczne, lub poddając próbom chemicznym, takim jak reakcja z chlorkiem trójfenylotetrazolowym w połączeniu z chromatografią cienkowarstwową.

Frakcje aktywne łączy się i pod zmniejszonym ciśnieniem odpędza z nich rozpuszczalnik.

Ester uzyskany tym sposobem posiada zwykle dostateczną czystość, lecz w razie potrzeby może być poddany ponownemu oczyszczeniu na drodze chromatograficznej.

Oczyszczony ester kwasu klawulanowego można

przeprowadzić w kwas klawulanowy lub jego sól na drodze sposobów opisanych w belgijskim opisie patentowym nr 827926.

Szczególnie użytecznym sposobem odzyskiwania kwasu klawulanowego lub jego soli z estru jest wodoroliza estru benzylowego. Reakcje takie prowadzi się zwykle w obecności metalu grupy przejściowej jako katalizatora, przy zastosowaniu niskiego lub średniego ciśnienia wodoru. Reakcję można prowadzić w temperaturze podwyższonej, obniżonej lub równej temperaturze otoczenia, na przykład w temperaturze w granicach 0–100°C. Szczególnie korzystnymi warunkami prowadzenia takiego uwodornienia jest zastosowanie lekkiego nadciśnienia wodoru i temperatury zbliżonej do temperatury otoczenia (12–20°C). Reakcję można prowadzić w typowych rozpuszczalnikach takich jak niższe alkanole, na przykład etanol. Jak stwierdzono, szczególnie korzystnym katalizatorem jest pallad na węglu drzewnym.

W przypadku, gdy uwodornienie prowadzi się w obecności zasady, jako produkt uzyskuje się sól kwasu klawulanowego. I tak, sól litową, sodową lub potasową uzyskuje się w przypadku, gdy reakcję prowadzi się w obecności kwaśnego węglanu sodowego lub potasowego, lub węglanu litowego, sodowego lub potasowego.

W wyniku takich reakcji uzyskuje się dostatecznie czysty kwas klawulanowy lub jego sól (na przykład o czystości co najmniej 90%, a zwykle można uzyskiwać kwas całkowicie czysty).

Przykład I. *Streptomyces jumonjinensis* NRRL 5741 hoduje się w ciągu 7 dni w temperaturze 28°C na stałych; pochyłonych powierzchniach agarowych o następującym składzie:

Bacto — ekstrakt drożdżowy (Difco)	4,0 g/l
Bacto — ekstrakt słodowy (Difco)	10,0 g/l
Bacto — desktroza (Difco)	4,0 g/l

Powyższe składniki rozpuszcza się w wodzie destylowanej, pH roztworu doprowadza się do wartości 7,3 i dodaje

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

Narośl zeskrobaną z powierzchni używa się bezpośrednio do zaszczepienia 100 ml środowiska nasiennego umieszczonego w 500 ml kolbach stożkowych zamkniętych korkami piankowymi z tworzywa sztucznego. Skład środowiska jest następujący:

Tryptone (Oxoid)	5,0 g/l
Ekstrakt drożdżowy	3,0 g/l

Środowisko przed zaszczepieniem wyjaławia się w ciągu 15 minut w autoklawie pod ciśnieniem 1,05 at, w temperaturze 121°C. Zaszczepione, inkubuje się w ciągu 65 godzin w temperaturze 26°C umieszczając je na wstrząsarce obrotowej o 240 obrotach na minutę i skoku ok. 2,54 cm.

5 ml porcje środowiska nasiennego używane są do zaszczepiania 100 ml porcji środowiska fermentacyjnego umieszczonego w 500 ml kolbach stożkowych zaopatrzonych w korki piankowe.

Stosuje się trzy różne środowiska fermentacyjne o następujących składach:

Środowisko A

Glikoza	20 g/l
Mączka sojowa	10 g/l
CaCO ₃	0,2 g/l
Na ₂ SO ₄	0,5 g/l
COCl ₂ · 6H ₂ O	0,001 g/l

Rozdrobione w wodzie destylowanej

Środowisko B

Dekstryna	55 g/l
Mączka sojowa	20 g/l
Melasa	20 g/l
NaH ₂ PO ₄	1,3 g/l
KCl	1,0 g/l

Rozdrobione w wodzie destylowanej

Środowisko C

Ekstrakt drożdżowy (Oxoid)	10 g/l
Scotasol	20 g/l

Rozdrobione w wodzie destylowanej, przed sterylizacją pH środowiska doprowadza się do wartości 7.

Jako mączkę sojową stosuje się Arkasoy 50 z firmy British Arkday Co., Old Trafford, Manchester; Scotasol jest suszonym, rozpuszczalnym słołem gorzelnianym z firmy Thomas Borthwick Ltd., 69 Wellington Street, Glasgow, U. K.; dekstryna pochodzi z firmy C.P.C. (U.K.) Ltd., Trafford Park, Manchester U.K.).

Wszystkie środowiska fermentacyjne przed zaszczepieniem wyjaławia się w ciągu 15 minut w autoklawie pod ciśnieniem 1,05 at, w temperaturze 121°C.

Kolby z medium fermentacyjnym inkubuje się w temperaturze 26°C, umieszczając je na wstrząsarce obrotowej o prędkości 240 obrotów na minutę i o skoku około 2,54 cm. Drugiego dnia fermentacji z kolb pobiera się w warunkach jałowych 5 ml próbki medium i poddaje je następującemu postępowaniu:

Próbki odwirowuje się z prędkością 2200 obr/min w ciągu 10 minut, po czym oddziela warstwę wierzchnią. Oddzielona warstwa wykazuje działanie inhibujące wytwarzanie β-laktamazy przez E.coli J.T4 w standardowej próbie inhibowania β-laktamazy. Odpowiednia próbka inhibowania β-laktamazy opisana jest w belgijskim opisie patentowym nr 827926.

Przykład II. Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741 hoduje się na środowisku A w sposób opisany w przykładzie I. W równych odstępach czasu pobiera się ze środowiska fermentacyjnego w warunkach jałowych 5 ml próbki. Warstwę górną uzyskaną w wyniku odwirowania tych próbek w ciągu 10 minut z prędkością 2200 obr/min poddaje się licznym, opisanym niżej testom:

(a) badaniu działania przeciwbakteryjnego na przykładzie Klebsiella aerogenes A, przy zastosowaniu próby dyfuzji przez otwór w płytce agarowej,

(b) badaniu aktywności w próbie płytki agarowej KAG opisanej w belgijskim opisie patentowym nr 827926.

Rodzaj próby	Czas fermentacji (dni)			
	2	4	3	7
5 Srednica obszaru Klebsiella aerogenes (mm)	—	20,5	17,4	—
10 Srednica obszaru w próbie KAG (mm)	—	37,1	26,8	—

Próbki z 4 dnia fermentacji umieszcza się na paskach bibuły chromatograficznej Whatmana nr 1 o szerokości 1 cm i podaje w ciągu nocy w temperaturze 4°C rozwijaniu przy pomocy następujących układów rozpuszczalników:

n-butanol:etanol:woda

4:1:5 (w % objętościowych)

n-butanol:kwasy octowe:woda

12:3:5 (w % objętościowych)

Następnie paski suszy się i umieszcza na płytkach agarowych zakażonych Klebsiella aerogenes NCTC 418 i zawierających penicylinę C (płytki KAG), po czym całość inkubuje w ciągu 16 godzin w temperaturze 28°C. Porównując wyniki uzyskane dla obu układów rozpuszczalników można stwierdzić, że w przypadku układu butanol/kwas octowy/ woda pojedyncza strefa inhibowania występuje przy R_F = 0,72, a; w przypadku układu butanol/ etanol/ woda — przy R_F = 0,25. W tym samym układzie rozpuszczalników wartości R_F dla zwykłych próbek są takie same jak dla autentycznych próbek kwasu klawulanowego.

Przykład III. Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741 hoduje się w ciągu 7 dni w temperaturze 26°C na stałych, nachylonych powierzchniach agarowych umieszczonych w kolbach Roux. Środowisko agarowe tworzy:

Bacto — Yesast Malt Ekstrakt Agar (ISP — środowisko 2).

(Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.).

Do kolby Roux'a dodaje się 100 ml jałowej, zdemineralizowanej wody zawierającej 0,05% Tritonu X (środek powierzchniowo czynny), po czym zeszkrobuję hodowlę z powierzchni w celu utworzenia zawiesiny komórek i zarodków. 100 ml uzyskanej zawiesiny używa się do zaszczepienia 50 litrów środowiska nasiennego umieszczonego w zaopatrzonej w przegrody 90-litrowej kadzi fermentacyjnej z nierdzewnej stali.

Środowisko nasienne tworzy się z następujących składników:

	g/l
55 Tryptone (Oxoid)	5,0
Ekstrakt drożdżowy (Oxoid)	3,0
Środek przeciwpieniący	0,5
Całość rozrobiona w wodzie	

(Środek przeciwpieniący składa się z 10% Pluronic L81 (Ugine Kuhlmann Chemicals Ltd.) zdyspergowanego w oleju sojowym (British Oil and Cake Mills).

Przed zaszczepieniem środowisko wyjaławia się w kadzi fermentacyjnej parą wodną.

Po zaszczepieniu, środowisko nasienne wytrząsa

się przy użyciu płytki rozpryskującej o średnicy ok. 12,7 cm obracającej się z prędkością 240 obr/min. Do kadzi dostarcza się jałowe powietrze w ilości 50 litrów/minutę, utrzymując temperaturę środowiska w pobliżu 26°C. Hodowanie prowadzi się w ciągu 48 godzin.

7,5 litra środowiska nasiennego używa się do zaszczepiania 150 l środowiska fermentacyjnego umieszczonego w zaopatrzonej w przegrody 300 l kadzi fermentacyjnej ze stali nierdzewnej.

Środowisko fermentacyjne utworzone jest z następujących składników:

	g/l
Jednowodnian glikozy	20,0
Mączka sojowa	10,0
CaCO ₃	0,2
COCl ₂ · 6H ₂ O	0,001
Na ₂ SO ₄	0,5
Środek przeciwpieniący	0,5
Całość rozrobiona w wodzie	
(Mączkę sojową stanowi Arkasoy 50 z firmy British Arkady CO., Ltd., Old Trafford, Manchester).	

Stosuje się taki sam środek przeciwpieniący jak w środowisku nasennym.

Przed zaszczepieniem, środowisko wyjaławia się w kadzi fermentacyjnej przy pomocy pary wodnej.

Po zaszczepieniu, środowisko wstrząsa się przy pomocy płytki rozpryskującej o średnicy ok. 15,5 cm, obracającej się z prędkością 340 obr/min. Do kadzi dostarcza się jałowe powietrze w ilości 150 l/min, utrzymując temperaturę środowiska w pobliżu 26°C. Całą fermentację prowadzi się w ciągu 72 godzin.

Uzyskaną mieszaninę odwirowuje się i oddziela 140 l sklarowanego roztworu, doprowadzając jego pH do wartości 6,2. Następnie uzyskany roztwór przepuszcza się z prędkością 500 ml/min przez wypełnienie o wymiarach 15×130 cm, które stanowi anionit organiczny o charakterze mocnej zasady, taki jak Zerolit FF(ip) SRA61 (Zerolit Ltd U.K.). Następnie kolumnę przemywa się 15 l schłodzonej, zdemineralizowanej wody z prędkością 500 ml/min, po czym eluuje z tą samą prędkością schłodzonym, 1 m roztworem wodnym NaCl, zbierając frakcje 4-litrowe.

Frakcje sprawdza się przy pomocy standardowego testu biologicznego na płytkę KAG. Frakcje wykazujące odpowiednią aktywność (są to frakcje 2—19) łączy się, doprowadza ich pH do wartości 6,2, schładza i przepuszcza z prędkością 500 ml/min przez kolumnę wypełnioną warstwą Amberlite XAD-4 o wymiarach 30×125 cm (Rohm and Haas, Philadelphia, USA). Kolumnę przemywa się 5 l schłodzonego 1 m roztworu NaCl, po czym eluuje z prędkością 500 ml/min wodą zdemineralizowaną o temperaturze 5°C. Zbiera się frakcje 5 litrowe rozpoczynając od frakcji wymywających NaCl z kolumny. Frakcje 3—9 zawierające kwas klawulanowy łączy się ze sobą.

35 l połączonych frakcji zateża się 10-krotnie na drodze odwrotnej osmozy (De Danske Sukkerfabrikker Laboratory Module; membrana typu 995). Prowadzenie procesu polega na recykulowaniu frakcji ze zbiornika wykonanego ze stali nierdzew-

nej, zaopatrzonego w układ chłodzący i tak ustawiony zawór wylotowy z układu ultrafiltracji, by uzyskać różnicę ciśnień na 40 membranach równą 45 atmosfer. Temperaturę frakcji utrzymuje się w granicach 2—5°C, a pH w granicach 6,8 ± 0,1 przez dodawanie 2n roztworu HCl. 3,5 l uzyskanego koncentratu suszy się uzyskując 34 g brązowego, bezpostaciowego osadu.

2 g tego osadu oczyszcza się sposobem podanym w przykładzie 17 belgijskiego opisu patentowego nr 827926, uzyskując praktycznie czystą, krystaliczną, czterowodną sól sodową kwasu klawulanowego. 32 g uzyskanego wyżej, bezpostaciowego osadu poddaje się działaniu 10 mm bromku benzylu i 35 ml dwumetyloformamidu, mieszając mieszaninę w ciągu 4 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie odpędza się pod próżnią rozpuszczalniki, uzyskując w wyniku półpłynną pozostałość. Do pozostałości dodaje się 50 ml octanu etylu, po czym całość przesącza usuwając cały osad. Przesącz odparowuje się pod próżnią uzyskując w wyniku oleistą pozostałość.

W kolumnie umieszcza się przygotowaną w mieszaninie cykloheksanu i chloroformu w stosunku 1:1 warstwę Sephadex'u LH₂O (Pharmacia Lto.) o wymiarach 3,8×34 cm. Produkt reakcji estryfikowania rozpuszcza się w minimalnej ilości mieszaniny cykloheksanu i chloroformu w stosunku 1:1, i przepuszcza przez kolumnę, którą następnie eluuje się tą samą mieszaniną rozpuszczalników. Pierwsze 150 ml eluatu odrzuca się, po czym zbiera frakcje po 25 ml. Obecność klawulanianu benzylu wykrywa się umieszczając 5 mikrolitrowe próbki każdej frakcji na cienkich płytkach żelu krzemionkowego, po czym chromatogramy rozwija mieszaniną cykloheksanu i octanu etylu w stosunku 1:1. Klawulanian benzylu staje się widoczny po spryskaniu chromatogramu chlorkiem trójfenylo-tetrazolu. Uzyskaną wartość R_F porównuje się z autentyczną próbą klawulanianu benzylu analizowaną chromatograficznie w tych samych warunkach (chlorek trójfenylo-tetrazolu przygotowuje się przez zmieszanie 1 części 4% roztworu chlorku trójfenylo-tetrazolu w metanolu, z 1 częścią 1n roztworu sody kaustycznej).

Frakcje 30—45 zawierające klawulanian benzylu łączy się i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując w wyniku olej.

Produkt uzyskany z kolumny wypełnionej Sephadex'em LH₂O rozpuszcza się w minimalnej ilości mieszaniny cykloheksanu i octanu etylu w stosunku 1:1, i przepuszcza przez kolumnę zawierającą warstwę żelu krzemionkowego (żel krzemionkowy typu H do chromatografii cienkowarstwowej z firmy Merck) o wymiarach 2,5×28 cm, przygotowaną w tym samym rozpuszczalniku. Kolumnę eluuje się mieszaniną cykloheksanu i octanu etylu w stosunku 1:1, zbierając 28 frakcji po 7 ml, a następnie odbierając frakcje po 15 ml. Frakcje 31—33 umieszczone na cienkiej płytce chromatograficznej żelu krzemionkowego i spryskane chlorkiem trójfenylo-tetrazolu zabarwiają się na czerwono. Frakcje te łączy się i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem.

Uzyskany olej poddaje się analizie widmowej NMR i w podczerwieni, otrzymując wyniki identyczne jak w przypadku autentycznych próbek klawulanianu benzylu.

Przykład IV. Wytwarzanie klawulanianu sodowego.

0,5 g klawulanianu benzylu z przykładu III umieszczonego w 20 ml etanolu i 5 ml wody uwodarnia się w ciągu 25 minut w temperaturze pokojowej i pod ciśnieniem atmosferycznym w obecności 0,13 g katalizatora: 10% Pd/C, oraz w obecności 0,15 g kwaśnego węgla sodowego. Następnie katalizator odsącza się, przemywa wodą i etanolem, a połączone przesącze odparowuje pod próżnią. Produkt przekształca się z mieszaniny wody i acetonu uzyskując czterowodny klawulanian sodowy.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania soli kwasu klawulanowego o wzorze 1, **znamienny tym**, że prowadzi się hodowlę szczepu *Streptomyces jumonjinensis* a następnie usuwa się komórki ze środowiska fermentacyjnego, kontaktuje się sklarowaną brzoeczkę przy pH = 6—7, ze słabo lub silnie zasadową żywicą jonowymienną do momentu aż żywica zosta-

nie nasycona kwasem klawulanowym, wymywa się żywicę wodnym roztworem soli, rozdziela się frakcje wykazujące aktywność inhibitorów β -laktamazy, wysala się te frakcje i wyodrębnia sól kwasu klawulanowego.

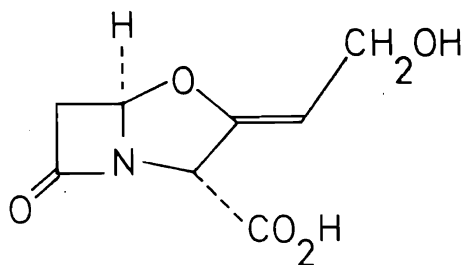
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowli poddaje się *Streptomyces jumonjinensis* NRRL 5741 lub jego wysoko wydajny mutant.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że dodatkowo wysala się lub wytrąca nierozpuszczalną w wodzie sól kwasu klawulanowego.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wysala się lub wytrąca klawulanian litowy, jako nierozpuszczalną w wodzie sól kwasu klawulanowego.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wytrącanie prowadzi się przez dodanie nierozpuszczalnego w wodzie rozpuszczalnika do wodnego roztworu względnie nierozpuszczalnego w wodzie soli kwasu klawulanowego.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wysalanie klawulanianu litowego prowadzi się w wodnym roztworze klawulanianu litowego, w obecności jonowego związku litu, na drodze zwiększania stężenia jonów litu w roztworze, tak aby znacznie przekroczyć rozpuszczalność klawulanianu litowego w danej temperaturze.



WZÓR 1