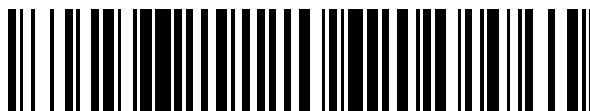


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 562**

51 Int. Cl.:

C07D 501/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2004** **E 04748601 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012** **EP 1658296**

54 Título: **Compuesto de cefem**

30 Prioridad:

28.05.2003 EP 03076636

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.04.2013

73 Titular/es:

**DSM SINOCHEM PHARMACEUTICALS
NETHERLANDS B.V. (100.0%)
Alexander Fleminglaan 1
2613 AX Delft , NL**

72 Inventor/es:

**VAN DEN BERG, MARCO, ALEXANDER;
BOVENBERG, ROELOF, ARY, LANS;
RAAMSDONK, LOURINA, MADELEINE, LEONIE;
SUTHERLAND, JOHN DAVID;
DE VROOM, ERIK y
VOLLINGA, ROELAND, CHRISTIAAN, ROEL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

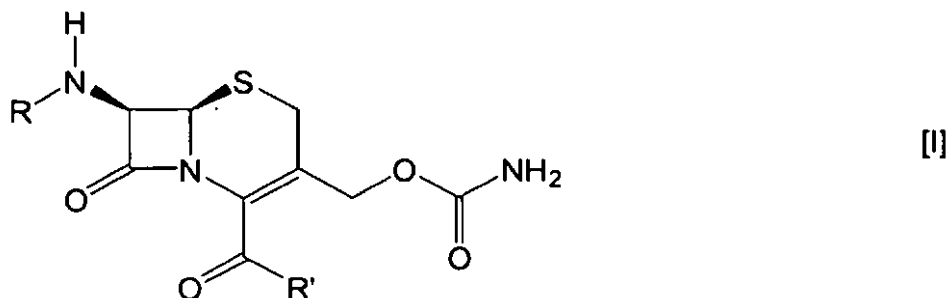
ES 2 400 562 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuesto de cefem

La presente invención se refiere a nuevos compuestos de cef-3-em y a un bioprocedimiento para la producción de estos compuestos. Un compuesto de cef-3-em según la presente invención se caracteriza por la fórmula [I]:



o una sal o éster del mismo,

en el que R se selecciona del grupo que consiste en

a) HOOC-X-CO-

en el que X se define como $(\text{CH}_2)_4$

o en el que X es $(\text{CH}_2)_m\text{-CH=A-(CH}_2)_n$ o $(\text{CH}_2)_m\text{-C}\equiv\text{C-(CH}_2)_n$, en el que m y n son cada uno individualmente 0, 1, 2 ó 3, y $m + n = 2$ ó 3, y A es CH o N,

o en el que X es $(\text{CH}_2)_p\text{-CH=CH-CH=C-(CH}_2)_q$, en el que p y q son cada uno individualmente 0 ó 1, y $p + q = 0$, o

b) $\text{Y-CH}_2\text{-CO-}$, en el que Y es fenilo, fenoxi o tetrazolilo

y en el que R' se selecciona del grupo que consiste en

c) OH

d) $\text{O-(alquilo de C1-6)}$, en el que el alquilo puede ser lineal o ramificado, y

e) $\text{O-C(alquilo de C1-6)-O-(alquilo de C1-6)}$, en el que los grupos alquilo pueden ser lineales o ramificados.

Este compuesto de cef-3-em [I] se puede usar como intermedio en la producción de antibióticos de cef-3-em comerciales. Como alternativa, este compuesto de cef-3-em [I] se puede convertir en otro intermedio, a saber, ácido 7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico, o una sal o éster del mismo.

Una ventaja particular de este compuesto de cef-3-em [I] es su estabilidad mejorada en las condiciones de purificación del compuesto, y/o la síntesis posterior de antibióticos de cef-3-em comercialmente atractivos en comparación con cefalosporina C. En virtud de ello, el compuesto preferido se puede aislar más fácilmente que la cefalosporina C.

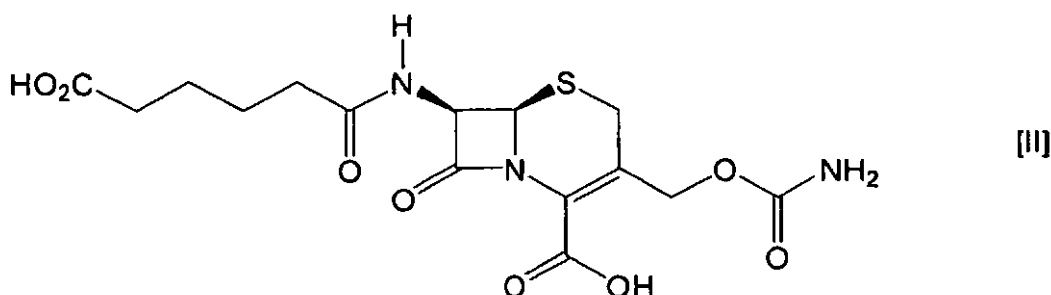
Los ejemplos de antibióticos de cef-3-em comerciales son cefacetrilo, cefaclor, cefaloglicina, cefalonio, cefaloridina, cefalotina, cefamandol, cefapirina, cefapirina, cefatrizina, cefazedona, cefazolina, cefbuperazona, cefcapeno pivoxilo, cefdinir, cefditoren pivoxilo, cefepima, cefixima, cefmenoxima, cefmetazol, cefminox, cefodizima, cefonicid, cefoperazona, ceforanid, cefotaxima, cefotiam, cefotiam hexetilo, cefpiramida, cefpiroma, cefpodoxima proxetilo, cefprozilo, cefroxadina, cefsulodina, ceftazidima, cefteteram pivoxilo, ceftexol, ceftibuteno, ceftiofur, ceftizoxima, ceftriaxona, cefuroxima, cefuroxima axetilo, cefuzonam.

La cefuroxima, cefoxitina y cefcapeno pivoxilo son ejemplos de antibióticos cefalosporínicos, que comparten un grupo 3-carbamoiloximetilo, y que no se pueden producir fácilmente a partir de los intermedios de cef-3-em actualmente disponibles, tales como 7-ACA. Los compuestos de cef-3-em según la presente invención poseen un grupo 3-carbamoiloximetilo, y se pueden convertir fácilmente en estos antibióticos cefalosporínicos así como en otros antibióticos de cef-3-em usando técnicas bien conocidas.

La cefazolina, ceftazidina y ceftriaxona son otros antibióticos cefalosporínicos muy preferidos que se pueden preparar a partir de un compuesto de fórmula [I] según técnicas bien conocidas.

Además, el compuesto según la fórmula [I] se puede usar él mismo como un antibiótico.

Un compuesto muy preferido según la presente invención es el compuesto de la fórmula [II] (ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico).



El compuesto de cef-3-em según la presente invención se puede producir químicamente según métodos conocidos en la técnica, o mediante fermentación o mediante una combinación de una o más etapas de biotransformación y una o más etapas de fermentación y/o una o más etapas de conversión química.

La presente invención también comprende un método fermentativo para la producción de un compuesto de cef-3-em [I] como metabolito secundario a partir de un microorganismo adecuado genéticamente alterado.

Para la producción fermentativa de los compuestos de cef-3-em según la presente invención, preferiblemente se puede hacer uso de microorganismos, que poseen inherentemente al menos parte de la ruta metabólica para la producción de β -lactama. Por ejemplo, se pueden usar microorganismos que poseen al menos parte de la ruta metabólica para la producción de compuestos β -lactámicos de penam o cef-3-em. Los organismos adecuados para este fin son, por ejemplo, hongos del género *Penicillium*, tales como *P. chrysogenum*, o del género *Acremonium*, tal como *A. chrysogenum*, o del género *Aspergillus*, tal como *A. nidulans*, o bacterias del género *Streptomyces*, tal como *S. clavuligeris*, o del género *Nocardia*, tal como *N. lactamdurans*, o del género *Lysobacter*, tal como *L. lactamgenus*.

Se cree que la biosíntesis del compuesto de cef-3-em O-carbamoiado cefamicina C en microorganismos tiene lugar según el esquema representado en la Fig. 1. La síntesis de cefalosporina C se representa en el esquema según Fig.2

Preferiblemente, tales organismos genéticamente alterados se cultivan en condiciones en las que, en el compuesto de cef-3-em resultante, la cadena lateral α -amino-adipilica que está presente en la posición 7 en los compuestos de cef-3-em naturales se sustituirá por una cadena lateral deseada según la presente invención. Para este fin, se suministra a la conversión enzimática *in vivo* una composición capaz de proporcionar esta cadena lateral.

De forma adecuada, la conversión enzimática *in vivo* se puede suministrar mediante un precursor de cadena lateral seleccionado del grupo que consiste en

i) un compuesto $Y-CH_2-COOH$, o una sal o éster del mismo, en el que Y es fenilo, fenoxi o tetrazolilo,

ii) un compuesto de la fórmula general $HOOC-X-COOH$, o una sal o éster del mismo,

en el que X se define como $(CH_2)_4$

o en el que X es $(CH_2)_m-CH=A-(CH_2)_n$ o $(CH_2)_m-C\equiv C-(CH_2)_n$, en el que m y n son cada uno individualmente 0, 1, 2 ó 3, y $m+n=2$ ó 3, y A es CH o N,

o en el que X es $(CH_2)_p-CH=CH-CH=C-(CH_2)_q$, en el que p y q son cada uno individualmente 0 ó 1, y $p+q=0$ ó 1

Si se usa *A. chrysogenum* como el organismo productor manipulado genéticamente, se debería introducir *penDE*, que codifica isopenicilina N aciltransferasa (Alvarez, E., B. Meesschaert, E. Montenegro, S. Gutiérrez, B. Díez, J. L. Barredo, y J. F. Martín. 1993. Eur. J. Biochem. 215:323-332) y *cmcH*, que codifica carbamoiiltransferasa (Coque, J.J. R., F. J. Perez-Llarena, F. J. Enguita, J. L. Fuente, J. F. Martín, y P. Liras. 1995. Gene 162:21-27). Adicionalmente, a fin de evitar productos secundarios indeseados, se debería inactivar al menos el gen *cefG* que codifica DAC acetiltransferasa (Felix, H.R., J. Neusch, y W. Wehrli. 1980. FEMS Microbiol. Lett. 8: 55-58; Fujisawa, Y., y T. Kanzaki. 1975. Agric. Biol. Chem. 39:2043-2048) y también preferiblemente los genes *cefD1* y *cefD2* juntos, que codifican IPN epimerasa (Ullan RV, Casqueiro J, Banuelos O, Fernandez FJ, Gutierrez S, Martin JF. 2002. J Biol Chem 277(48):46216-25).

Si se escoge *N. lactamdurans* o *S. clavuligerus* como el organismo productor genéticamente manipulado, se requiere la introducción y expresión del *penDE* y preferiblemente se puede inactivar el gen *cefD* (Jayatilake, S., J.A. Huddleston, y E.P. Abraham. 1981. Biochem. J. 195:645-647; Konomi, T., S. Herchen, J.E. Baldwin,

M. Yoshida, N.A. Hunt, y A.L. Demain. 1979. Biochem. J. 184:427-430) y el gen *cmcl* que codifica OCDAC hidroxilasa (Xiao, X., G. Hintermann, A. Hausler, P. J. Barker, F. Foor, A. L. Demain, y J. Piret. 1993. Agents Chemother. 37:84-88), y opcionalmente también el gen *cmcJ* que codifica metil transferasa o cefamicina C sintetasa (Coque, J.J. R., F. J. Perez-Llarena, F. J. Enguita, J. L. Fuente, J. F. Martin, y P. Liras. 1995. Gene 162:21-27), de las cuales estas dos últimas son las enzimas tardías de la biosíntesis de cefamicina (tal como se describe en el documento WO 95/29253), a fin de evitar productos secundarios indeseados.

Si se escoge *L. lactamgenus* como hospedante, al menos se debería introducir *penDE* y *cmcH*, y preferiblemente se debería de inactivar *cefD*.

La inserción e inactivación de genes en organismos a fin de proporcionar el genotipo para la producción de un compuesto según la presente invención se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos en la técnica. Para la inserción, se puede hacer uso de secuencias de ADN genómico o, si se desea, se puede hacer uso de ADNc.

Los microorganismos preferidos para la producción fermentativa de compuesto de la presente invención son *P. chrysogenum* y *A. chrysogenum*, que mediante ingeniería genética se han proporcionado con fragmentos de ADN que codifican enzimas adecuadas para la producción del actual compuesto y en los que, en el caso de *A. chrysogenum*, se han inactivado los genes apropiados.

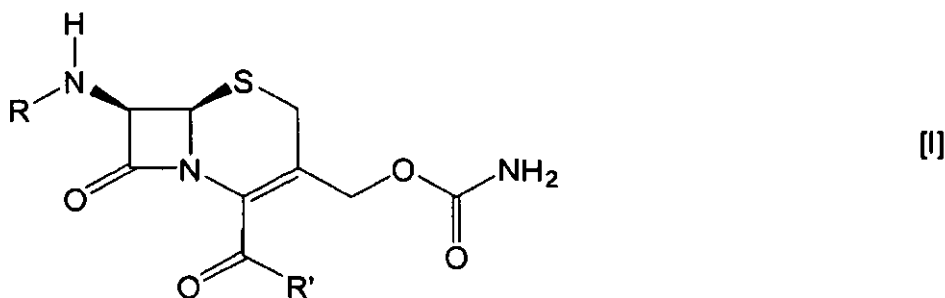
Más preferiblemente, la producción fermentativa del compuesto según la presente invención tiene lugar en *P. chrysogenum* genéticamente manipulado de manera adecuada.

Para este fin, se ha proporcionado una cepa de *P. chrysogenum* capaz de producir isopenicilina N con el siguiente conjunto de fragmentos de ADN:

- 1) ADN que codifica una enzima expandasa
- 2) ADN que codifica una enzima hidroxilasa
- 3) ADN que codifica una enzima O-carbamoil transferasa

Como alternativa, se puede introducir ADN que codifica la enzima bifuncional expandasa/hidroxilasa, en lugar de ADN que codifica las enzimas expandasa e hidroxilasa por separado, respectivamente.

En una realización preferida, la invención se refiere a un procedimiento para la producción fermentativa de un compuesto de fórmula [I]



o una sal o éster del mismo, en el que R se selecciona del grupo que consiste en

- a) HOOC-X-CO-

en el que X se define como $(CH_2)_4$

o en el que X es $(CH_2)_m-CH=A-(CH_2)_n$ o $(CH_2)_m-C\equiv C-(CH_2)_n$, en el que m y n son cada uno individualmente 0, 1, 2 ó 3, y $m+n=2$ ó 3, y A es CH o N,

o en el que X es $(CH_2)_p-CH=CH-CH=C-(CH_2)_q$, en el que p y q son cada uno individualmente 0 ó 1, y $p+q=0$, o

- b) Y-CH₂-CO-, en el que Y es fenilo, fenoxi o tetrazolilo

y en el que R' se selecciona del grupo que consiste en

- (c) OH

- (d) O-(alquilo de C1-6), en el que el alquilo puede ser lineal o ramificado, y

(e) O-C(alquilo de C1-6)-O-(alquilo de C1-6), en el que los grupos alquilo pueden ser lineales o ramificados, que comprende las etapas de:

A) mantener, en un medio de cultivo capaz de sostener su crecimiento, una cepa de *P. chrysogenum* que produce isopenicilina N y añadir a dicho medio de cultivo una materia prima que comprende uno cualquiera o más precursores de cadena lateral seleccionados del grupo que consiste en

i) un compuesto p $Y-CH_2-COOH$, o una sal o éster del mismo, en el que Y es fenilo, fenoxi o tetrazolilo,

ii) un compuesto de la fórmula general $HOOC-X-COOH$, o una sal o éster del mismo, en el que X se define como $(CH_2)_4$

o en el que X es $(CH_2)_m-CH=A-(CH_2)_n$ o $(CH_2)_m-C\equiv C-(CH_2)_n$, en el que m y n son cada uno individualmente 0, 1, 2 ó 3, y $m + n = 2$ ó 3, y A es CH o N,

o en el que X es $(CH_2)_p-CH=CH-CH=C-(CH_2)_q$, en el que p y q son cada uno individualmente 0 ó 1, y $p + q = 0$ ó 1

o sus sales y ésteres que son capaces de ser asimilados y utilizados por dicha cepa de *P. chrysogenum* para producir un ácido acil-6-aminopenicilánico (acil-6-APA) adecuado, con lo que se produce dicho acil-6-APA;

B) llevar a cabo las siguientes conversiones enzimáticas mediante la expresión in situ de los genes correspondientes:

i) el acil-6-APA se expande anularmente *in situ* para formar el ácido acil-7-amino-desacetoxicefalosporánico (acil-7-ADCA) correspondiente mediante la enzima expandasa, en el que dicha cepa de *P. chrysogenum* se ha transformado mediante ADN que codifica la enzima expandasa capaz de aceptar como sustrato dicho acil-6-APA, con lo que, como resultado de su expresión, dicho acil-6-APA producido por dicha cepa es también después expandido anularmente in situ para formar el acil-7-ADCA correspondiente;

ii) la cadena lateral 3-metilica de dicho acil-7-ADCA es hidroxilada in situ para producir el acil-7-ADAC correspondiente mediante la enzima hidroxilasa, en el que dicha cepa de *P. chrysogenum* se ha transformado mediante ADN que codifica la enzima hidroxilasa capaz de aceptar como sustrato dicho acil-7-ADCA, con lo que, como resultado de su expresión, dicho acil-7-ADCA producido por dicha cepa es también después hidroxilado in situ para formar el acil-7-ADAC correspondiente;

iii) la cadena lateral 3-hidroximetilica de dicho acil-7-ADAC es O-carbamoilada in situ para producir el compuesto según la fórmula [I] mediante la enzima O-carbamoil transferasa, en el que dicha cepa de *P. chrysogenum* se ha transformado mediante ADN que codifica la enzima O-carbamoil transferasa capaz de aceptar dicho acil-7-ADAC como sustrato, con lo que, como resultado de su expresión, dicho acil-7-ADAC producido por dicha cepa es también después carbamoilado in situ para formar un compuesto según la presente invención.

El ADN que codifica la enzima expandasa, la enzima hidroxilasa o la enzima O-carbamoil transferasa, para uso según la presente invención, se puede obtener a partir de microorganismos que se da a conocer que contienen este ADN y que están disponibles de colecciones de cultivo, o se puede obtener a partir de microorganismos aislados de fuentes naturales apropiadas.

Los ejemplos de microorganismos que se da a conocer que contienen la enzima expandasa son *A. chrysogenum* (cefEF), *S. clavuligerus* (cefE), *N. lactamdurans* (cefE), *L. lactamgenus* (cefE).

Los ejemplos de microorganismos que se da a conocer que contienen la enzima hidroxilasa son *A. chrysogenum* (cefEF), *S. clavuligerus* (cefF), *N. lactamdurans* (cefF), *L. lactamgenus* (cefF).

Los ejemplos de microorganismos que se da a conocer que contienen la enzima O-carbamoil transferasa son especies del orden Actinomicetos, y en particular del género Streptomyces. Basándose en la descripción de la patente US nº 4.075.061, las especies particularmente adecuadas que se pueden emplear para proporcionar el ADN que codifica la actividad de O-transcarbamoilasa deseada incluyen *S. clavuligerus*, por ejemplo la cepa NRRL 3585 como se describe en la patente británica nº 1.315.177; *S. wadayamensis*, por ejemplo la cepa ATCC 21948 como se describe en la solicitud de patente holandesa nº 7308948; *S. albogriseolus*, por ejemplo la cepa NRRL 5735 como se describe en la patente U.S. nº 3.914.158; *S. lactamdurans*, por ejemplo la cepa NRRL 3802 como se describe en la patente británica nº 1.321.412; y *S. jumonjinensis*, por ejemplo la cepa NRRL 5741 como se describe en la patente británica nº 1.387.965.

Según la descripción de la Publicación de Patente WO 95/29253, otras fuentes adecuadas del ADN que codifica O-carbamoil transferasa deseada pueden ser *N. lactamdurans*, *S. lipmanii*, *S. panayensis*, *S. cattleya*, *S. griseus*, *S. todominensis*, *S. filipinensis cephamicini* y *S. heteromorphus*.

La transformación de células hospedantes, por ejemplo de *P. chrysogenum* u otros hongos, se pueden lograr, en general, por diferentes medios de suministro de ADN, como captación de protoplastos mediada por PEG-Ca, electroporación o técnicas de pistola de partículas, y selección de transformantes. Véase, por ejemplo, Van den Hondel y Punt, "Gene and Transfer and Vector Development for Filamentous Fungi", en: Applied Molecular Genetics of Fungi (Peberdy, Laten, Ogden, Bennett, eds.), Cambridge University Press (1991). Se ha descrito la aplicación de marcadores de selección dominantes y no dominantes (Van den Hondel et al., más arriba). Se han descrito marcadores de selección de origen tanto homólogo (derivados de *P. chrysogenum*) como heterólogo (no derivado de *P. chrysogenum*) (Gouka et al., J. Biotechnol. 20 (1991) 189-200).

Es bien conocida la aplicación de diversos marcadores de selección de transformantes homólogos o heterólogos, en presencia o ausencia de secuencias vector, físicamente enlazados o no al ADN no seleccionable, en la selección de transformantes.

La secuencia de ADN que codifica la actividad de expandasa, la actividad de hidrolasa y la actividad de O-carbamoil transferasa se introduce y se expresa de esta manera en *P. chrysogenum*, por ejemplo en la cepa Wisconsin 54-1255 (depositada en la ATCC con el número de acceso 28089). También son adecuadas otras cepas de *P. chrysogenum*, incluyendo mutantes de la cepa Wisconsin 54-1255, que tienen un rendimiento beta-lactámico mejorado. Los ejemplos de tales cepas de alto rendimiento son las cepas CBS 455.95, Panlabs P2 y ASP-78 (Barredo JL, Alvarez E, Cantoral JM, Diez B, Martin JF. 1988. Antimicrob Agents Chemother 32(7):1061-7).

Además, el gen *cmcH* junto con los genes *cefE* y *cefF* o *cefEF* se colocan bajo el control transcripcional y traduccional de elementos de control heterólogos u homólogos, preferiblemente bajo el control de elementos de control de genes fúngicos. Esos elementos se pueden obtener a partir de genes fúngicos clonados como el gen IPNS o *pcbC* de *P. chrysogenum*, el gen de β -tubulina, el gen *gpdA* de *A. nidulans*, o el gen *glaA* de *A. niger*.

Como alternativa a una producción fermentativa completa, el compuesto según la presente invención se puede preparar mediante una combinación de una o más etapas fermentativas y una o más etapas de biotransformación y/o una o más etapas de conversión química.

Por ejemplo, en una primera etapa se puede producir de forma fermentativa un derivado adecuado de penicilina, tal como penicilina G o penicilina V, o un derivado de cefalosporina tal como adipoil-7-ADCA o adipoil-7-ADAC.

Un derivado de penicilina adecuado se puede someter opcionalmente a intercambio del grupo 6-acilo antes de la conversión en el compuesto de 7-acil-3-metil-cef-3-em correspondiente. A su vez, este último se puede convertir en el 7-acil-3-hidroxi-metil-cef-3-em correspondiente, y finalmente en el compuesto de fórmula [I].

Para estas conversiones, las enzimas necesarias (aciltransferasa, expandasa, hidroxilasa y carbamoiltransferasa, o, como alternativa, aciltransferasa, expandasa-hidroxilasa y carbamoiltransferasa, codificadas por los genes *penDE*, *cefE*, *cefF* y *cmcH* o los genes *penDE*, *cefEF* y *cmcH*, respectivamente) se pueden producir separadamente en cualquier hospedante adecuado. Por ejemplo, esto se hace en *Escherichia coli* según un procedimiento conocido en la técnica. Las enzimas se pueden purificar y, si es necesario, inmovilizar, o se pueden usar en biotransformaciones de células completas o extractos brutos libres de células, en vasijas de reacción individuales y consecutivas, o en una reacción de una sola cazuela, para formar el compuesto de fórmula [I].

Las etapas individuales en esta ruta de múltiples etapas (por ejemplo penicilina G $\rightarrow$ acil-6-APA $\rightarrow$ acil-7-ADCA $\rightarrow$ acil-7-ADAC $\rightarrow$ compuesto [I]) se pueden intercambiar por etapas fermentativas o de conversión química. Por ejemplo, la primera etapa se puede omitir si se usa adipoil-7ADCA producido por *P. chrysogenum* transformado con *cefE* (por ejemplo según el método descrito en el documento EP0523341), o, como alternativa, las dos primeras etapas se pueden omitir partiendo de acil-7-ADAC producido por *P. chrysogenum* transformado con *cefE* y *cefF* (por ejemplo según el método descrito en el documento EP0540210). Como alternativa, se pueden aplicar conversiones químicas conocidas en la técnica para cada etapa individual.

Breve descripción de las Figuras:

Fig. 1: Representación esquemática de producción fermentativa de cefamicina C en *S. clavuligerus*.

Fig. 2: Representación esquemática de producción fermentativa de cefalosporina C en *A. chrysogenum*.

Fig. 3: Plásmido usado para clonar el gen *cefE* y para la transformación de Wisconsin 54-1225.

Fig. 4: Plásmido usado para clonar el gen *cefF* y para la transformación de Wisconsin 54-1225.

Fig. 5: Plásmido usado para clonar el gen *cefEF* y para la transformación de Wisconsin 54-1225.

Fig. 6: Plásmido usado para clonar el gen *cmcH* y para la transformación de Wisconsin 54-1225.

- Fig. 7: Plásmido usado para clonar el gen *amdS* y para la transformación de Wisconsin 54-1225.
- Fig. 8: Representación esquemática del proceso fermentativo según la presente invención.
- Fig. 9: Espectro de RMN del ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico.
- Fig. 10: Espectro de RMN del ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico preparado según el Ejemplo 3.
- Fig. 11: Plásmido pGK105.
- Fig. 12: Análisis de HPLC/MS del producto de bioconversión mediante carbamoil transferasa que produce ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico.
- Fig. 13: Distribución intracelular (A) y extracelular (B) de ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico y otras β -lactamas (en mmoles) en *P. chrysogenum* transformado según el Ejemplo 2.
- Fig. 14: Inhibición del crecimiento por adipoil-7-ADCA, adipoil-ACCA y cefuroxima en *B. subtilis*.
- Fig. 15: Inhibición del crecimiento por adipoil-7-ADCA, adipoil-ACCA y cefuroxima en *E. coli*.
- Fig. 16: Inhibición del crecimiento por adipoil-7-ADCA, adipoil-ACCA y cefuroxima en *M. luteus*.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Transformación de una cepa de *P. chrysogenum* con los genes que codifican la actividad de expandasa, hidroxilasa y 3'-hidroximetilcefem O-carbamoiltransferasa

En la presente solicitud se usan técnicas normales usadas en procedimientos de clonación de genes. Estas técnicas incluyen reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), síntesis de oligonucleótidos sintéticos, análisis de secuencia nucleotídica de ADN, ligación enzimática y restricción de ADN, subclonación de vector de *E. coli*, transformación, y selección de transformantes, aislamiento y purificación de ADN, caracterización de ADN mediante análisis de transferencia Southern. Estas técnicas son muy bien conocidas en la técnica y se describen de forma adecuada en muchas referencias.

Las transformaciones se llevaron a cabo con la cepa Wisconsin 54-1255 de *P. chrysogenum* (ATTC 28089). Todos los constructos introducidos en *P. chrysogenum* están bajo el control del promotor de IPNS de *P. chrysogenum* y del terminador de AT. También son adecuadas otras cepas de *P. chrysogenum*, incluyendo mutantes de la cepa Wisconsin 54-1255, que tienen un rendimiento β -lactámico mejorado. Un ejemplo de tal cepa es CBS 455.95.

El cultivo de *P. chrysogenum* para la generación de protoplastos usados en la transformación se realiza en medio YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de glucosa). Es bien conocido en la técnica que los procedimientos de formación de protoplastos y regeneración pueden diferir ligeramente dependiendo de la cepa particular de *P. chrysogenum* usada y del procedimiento de selección de transformantes aplicado.

Se hizo crecer ATCC 27064 de *S. clavuligerus* en caldo de soja triptico (Difco). Se usó ADN cromosómico de esta cepa para el aislamiento del gen *cefE* mediante PCR. El cebador directo de 5' 4363: 5'-GAT CAG TGA CAG TTG CAT ATG GAC ACG ACG GTG CCC ACC TTC AGC CTG-3' (SEC ID NO. 1) y el cebador inverso de 3' número 4364: 5'-CCC GGG TCT AGA TCT AGA CTA TGC CTT GGA TGT GCG GCG GAT GTT-3' (SEC ID NO. 2) se diseñaron usando la secuencia publicada de *CefE* de *S. clavuligerus* (Kovacevic S, Weigel BJ, Tobin MB, Ingolia TD, Miller JR. J Bacteriol (1989) 171(2):754-60; Ingolia et al. patente U.S. n° 5.070.020).

El producto de la PCR obtenido se cortó con *NdeI* y *XbaI*, y el fragmento de 0,9 kb se ligó con pMcTNdel, también cortado con *NdeI* y *XbaI* (fragmento: 3,9 kb), dando como resultado pMcTSE. pMcTNdel es un derivado de pMC-5 (Stanssens et al., NAR (1989) 17: 4441), y se construyó mediante inserción de un fragmento que codifica el promotor tac seguido de un sitio de secuencia de unión al ribosoma (RBS) y un sitio de clonación de *NdeI* (véase también la patente E.P. n° 0.351.029).

En primer lugar, el promotor AT se clonó delante del gen de expandasa. El promotor AT se obtuvo mediante PCR usando el cebador 4488: 5'-AGA ACG GAT TAG TTA GTC TGA ATT CAA CAA GAA CGG CCA GAC-3' (SEC ID NO. 3) y 4489: 5'-GAC AGA GGA TGT GAA GCA TAT GTG CTG CGG GTC GGA AGA TGG-3' (SEC ID NO. 4) en ADN cromosómico de *P. chrysogenum*. Los oligo se basaron en la secuencia del gen *penDE* de *P. chrysogenum* publicada por Barredo et al., (1989) Gene 83:572-576 y Diez et al., Mol. Gen. Genet. (1989) 218: 572-576. El producto se digirió con *EcoRI* y *NdeI*, dando como resultado un fragmento de 1,5 kb. Este fragmento se ligó con el fragmento de *EcoRI-XbaI* de pBluescript (Stratagene) de 3,0 kb, y con el fragmento de *NdeI-XbaI* de pMcTSE de 0,9

kb que contiene el gen de expandasa de *S. clavuligerus*. Esto da como resultado el plásmido pASE que contiene el gen de expandasa detrás del promotor AT.

El terminador de *penDE* (que codifica AT) se clonó detrás del gen de expandasa en el plásmido pASE. Por lo tanto, se usó ADN cromosómico de *P. chrysogenum* como molde para la PCR del terminador de AT usando el cebador directo de 5' 4579: 5'-TTC GAT GTC AGC CTG GAC GGC GAG ACC GCC ACG TTC CAG GAT TGG ATC GGG GGC AAC TAC GTG AAC ATC CGC CGC ACA TCC AAG GCA TGA AGG CTC TTC ATG ACG-3' (SEC ID NO. 6) y el cebador inverso de 3' 4507: 5'-GGA CTA GTG TCG ACC CTG TCC ATC CTG AAA GAG TTG (SEC ID NO. 5). El fragmento se digirió con *BglI-SpeI*, y el producto de 0,6 kb se ligó con el plásmido pASE digerido con *SpeI* y *BglI*, dando como resultado pASEWA.

Finalmente, el gen de expandasa se colocó detrás del promotor de IPNS de *P. chrysogenum* (el promotor de IPNS que sustituye al promotor de AT). El promotor de IPNS se amplificó usando ADN cromosómico de *P. chrysogenum* como molde con el oligo de 5' 4923: 5'-CGA GGG GAA TTC CTT ATA CTG GGC TG CTG CAT TGG TCT G (SEC ID NO. 7) (usando la secuencia publicada por: Diez, B., Gutierrez, S., Barredo, J.L., van Solingen, P., van der Voort, L.H. y Martin, J.F. (1990) J. Biol. Chem. 265 (27), 16358-16365) y el oligo de 3' 4924: 5'-CCC GGG CAT ATG CAT ATG GGT GTC TAG AAA AAT AAT GGT GAA AAC (SEC ID NO. 8) (usando la secuencia publicada por Carr LG, Skatrud PL, Scheetz ME 2°, Queener SW, Ingolia TD. (1986) Gene 48(2-3):257-66). pASEWA se digirió con *EcoRI* y *NdeI*, dando como resultado un fragmento de 4,6 kb con el gen de expandasa, y el terminador de AT se ligó con el producto de la PCR del promotor de IPNS de 0,9 kb digerido con *EcoRI-NdeI*. Esto produce pISEWA. El gen *cefE* con el promotor de IPNS y el terminador de AT se obtuvo de pISEWAn mediante una digestión con *NotI* (fig. 3).

El gen de hidroxilasa (*cefF*) se aisló de *S. clavuligerus* (ATCC 27064). El ADN cromosómico de esta cepa se usó para el aislamiento del gen *cefF* mediante PCR usando un sitio de *NdeI* en dirección 5' del gen y un sitio de *NsiI* en dirección 3'. Este constructo se ligó detrás del promotor de IPNS y delante del terminador de AT, dando como resultado pISFWA. Para la transformación de *P. chrysogenum*, el constructo que incluye el gen *cefF* y el promotor de IPNS y el terminador de AT se aisló de pISFWA (Fig. 4) después de cortar con *NotI*.

El gen de expandasa/hidroxilasa de *A. chrysogenum* (= *Cephalosporium acremonium*) (*cefEF*) se obtuvo de ADN cromosómico mediante PCR. El oligo directo diseñado introdujo un sitio de *NdeI*, y el oligo inverso un sitio de *NsiI*. Tras la digestión con *NdeI* y *NsiI*, el gen se pudo colocar en el vector de *Penicillium*, dando como resultado pICEFWA (fig. 5). Para la transformación de *Penicillium*, se aisló el *cefEF* de *A. chrysogenum* a partir de pICEFWA con el promotor de IPNS y el terminador de AT mediante una digestión con *NotI*.

El gen *cmcH* se obtuvo de *S. clavuligerus* mediante PCR en ADN cromosómico con el cebador directo: 5'-ACA GAC CAT ATG CTC GTC GTT GCA TTC AAG -3' (SEC ID NO. 9) y el cebador inverso: 5'-GAC GGC ATG CAT TCA GGA ACC GGC TAT TCG C-3' (SEC ID NO. 10), y se cortó con *NdeI*, *NsiI* y se ligó con el fragmento de *NdeI*, *NsiI* de pISEWAN (que sustituye el gen de expandasa por el gen *cmcH*), produciendo pIScCTWA (Fig. 6). El gen *cmcH*, que incluye el promotor de IPNS y el terminador de AT, se aisló de pIScCTWA mediante una digestión con *NotI*.

El fragmento de *AmdS* con flancos de *HelY* se aisló de pHELY-A1 mediante una digestión con *HindIII* (fig. 7).

Los constructos de *cmcH*, con *cefEF* o *cefE* y *cefF* se introdujeron mediante cotransformación con el marcador de selección *amdS* en ATCC 28089 de *P. chrysogenum*. La integración del marcador de *amdS* permite que los transformantes de *P. chrysogenum* crezcan en medio de selección que contiene acetamida como la única fuente de nitrógeno.

Las técnicas implicadas en la transferencia de ADN a protoplastos de *P. chrysogenum* son bien conocidas en la técnica y se describen en muchas referencias, incluyendo Finkelstein y Ball (eds.), *Biotechnology of filamentous fungi, technology and products*, Butterworth-Heinemann (1992); Bennett y Lasure (eds.) *More Gene Manipulations in fungi*, Academic Press (1991); Turner, en: Pühler (ed), *Biotechnology*, segunda edición completamente revisada, VHC (1992). La transformación de protoplastos mediada por Ca-PEG se usa como se describe en el documento EP635574.

Ejemplo 2

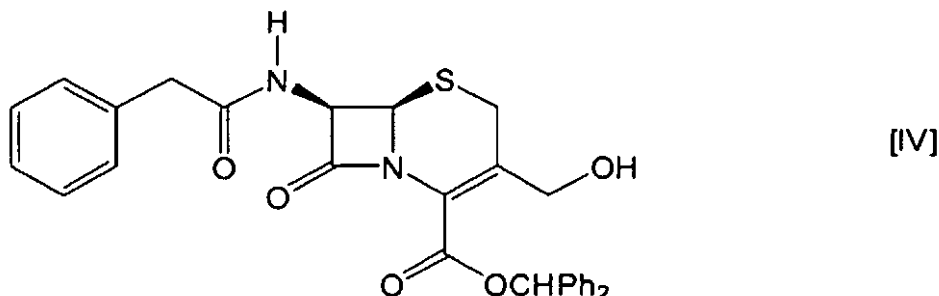
Producción fermentativa de ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico

Los transformantes de *P. chrysogenum* obtenidos según el Ejemplo 1 se inocularon a 2×10^6 conidios/ml en un medio como se describe para los ensayos de producción de penicilina V en el documento US20020039758, pero en lugar de fenoxiacetato de potasio se suplementó con 0,5-10 mg/ml de adipato de sodio como precursor de la cadena lateral (pH antes de la esterilización 5,5-6,0). La incubación tuvo lugar durante 144-169 horas a 25°C y 280 rotaciones por minuto. Los filtrados de los cultivos que se hicieron crecer en los pocillos se analizaron mediante HPLC y RMN para determinar la producción de ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico. El espectro de RMN muestra los picos característicos para el compuesto deseado (véase la figura 9).

Ejemplo 3

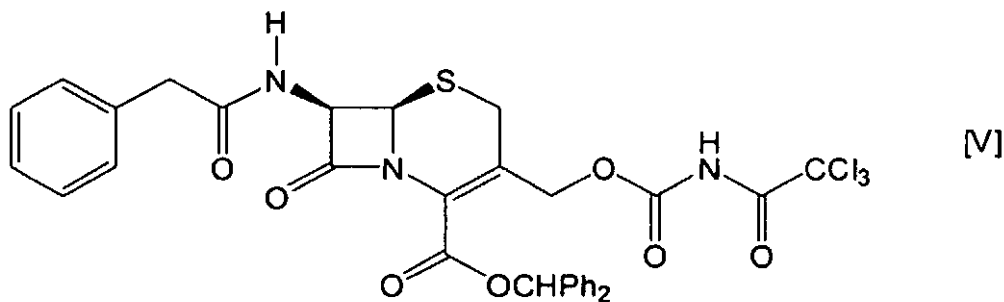
Síntesis química de ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico

PREPARACIÓN DE ÉSTER BENZHIDRÍLICO DEL ÁCIDO FENILACETIL-7-AMINO-3-HIDROXIMETIL-3-CEFEM-4-CARBOXÍLICO [IV]



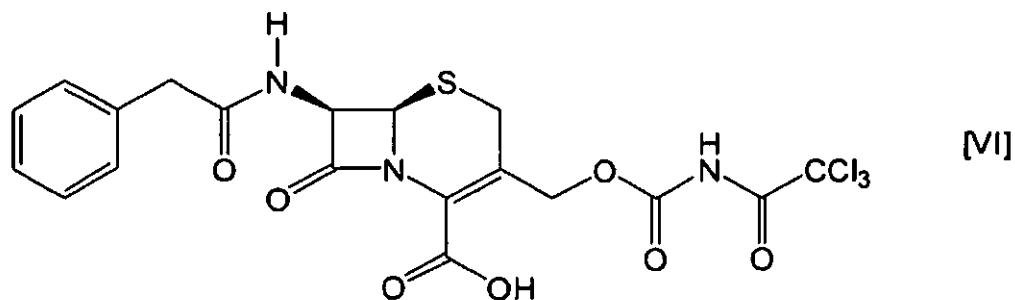
- 5 Se añadieron gota a gota 8,5 ml de disolución al 20% de NaOH a una disolución agitada de ácido 7-aminocefalosporánico (5 g, 18,3 mmoles) en agua (20 ml) a 0°C. Tras agitar durante 5 min., el pH se ajustó a 8,5 con ácido acético, y la disolución se diluyó con acetona (20 ml). Se añadió entonces gota a gota cloruro de fenilacetilo (2,9 ml, 22 mmoles) en acetona (3 ml) con el pH mantenido entre 7,5 y 8,5 mediante adición de NaOH acuoso. Después, la disolución se agitó durante 1 h a 0°C. La acetona se eliminó entonces a vacío antes de la adición de acetato de etilo (70 ml) y la acidificación de la fase acuosa hasta pH 3 con HCl diluido. La fase orgánica se separó, y la fase acuosa se volvió a extraer con otra porción de acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, (MgSO₄) y se filtraron. A esta disolución se añadió entonces una disolución de difenildiazometano (5 g, 25,8 mmoles) en acetato de etilo (5 ml) con agitación. La disolución se concentró hasta aprox. 40 ml a vacío y se dejó toda la noche a 4°C. El precipitado resultante se recogió mediante filtración y se lavó con acetato de etilo, dando el producto como un polvo blanco (3,83 g, 40%). δ_H ((CD₃)₂SO, 300 MHz) 3,54 y 3,63 (2H, ABq, *J* 13,9, PhCH₂), 3,65 (2H, s, SCH₂), 4,25 (2H, s, CH₂OH), 5,15 (1H, d, *J* 4,7, CHCHS), 5,76 (1H, dd, *J* 4,7, 8,2, NHCH), 6,94 (1H, s, CHPh₂) 7,2-7,6 (15H, m, Ph₂CH, PhCH₂), 9,17 (1H, d, *J* 8,2, NHCH). *M/z* (ES+) 537 (M+Na, 100%).

20 PREPARACIÓN DE ÉSTER BENZHIDRÍLICO DEL ÁCIDO TRICLOROACETIL-FENILACETIL-7-AMINO-3-CARBAMOIOLOXIMETIL-3-CEFEM-4-CARBOXÍLICO [V]



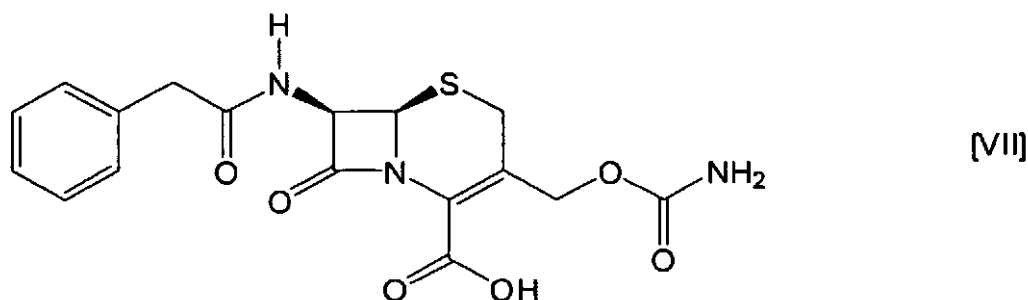
- 25 Se añadió isocianato de tricloroacetilo (0,23 ml, 1,9 mmoles) a una disolución agitada de [IV] (600 mg, 1,2 mmoles) en acetona (20 ml). Tras agitar durante 2 h, se recogió un precipitado blanco mediante filtración, se lavó con acetona y se secó (811 mg, 99%). δ_H ((CD₃)₂SO, 300 MHz) 3,54 y 3,62 (2H, ABq, *J* 13,9, PhCH₂), 3,66 y 3,76 (2H, ABq, *J* 18,5, SCH₂), 4,90 y 5,02 (2H, ABq, *J* 12,8, CH₂O), 5,20 (1H, d, *J* 4,8, CHCHS), 5,82 (1H, dd, *J* 4,8, 8,1, NHCH), 6,96 (1H, s, CHPh₂), 7,2-7,6 (15H, m, CHPh₂, PhCH₂), 9,17 (1H, d, *J* 8,1, NHCH), 12,0 (1H, s, CONHCO). *M/z* (ES-) 702 (M-1, 100%).

PREPARACIÓN DE ÁCIDO TRICLOROACETIL-FENILACETIL-7-AMINO-3-CARBAMOIOLOXIMETIL-3-CEFEM-4-CARBOXÍLICO [VI]



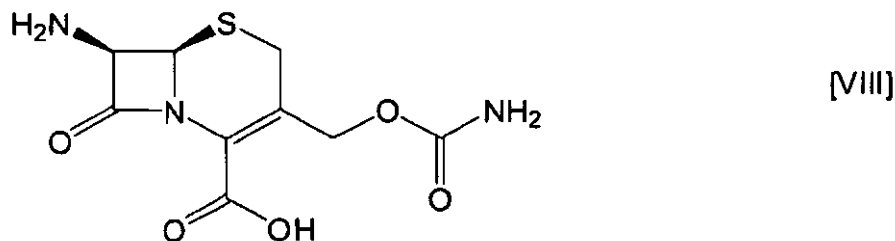
Se disolvió [V] (5,15 g, 7,33 mmoles) en una mezcla enfriada (0°C) de ácido trifluoroacético (35 ml) y anisol (4 ml). Tras agitar durante 2 h, la disolución se concentró *a vacío* hasta un aceite que se trituró con éter de petróleo (fracción de 40-60°C), después se disolvió en acetato de etilo (30 ml) y se decoloró con carbón. Tras filtrar, la disolución se concentró *a vacío* hasta un aceite amarillo, que se usó para la etapa siguiente sin purificación adicional. δ_H ((CD₃)₂SO, 300 MHz) 3,50-3,75 (4H, m, PhCH₂, SCH₂), 4,94 (1H, parte ABq, *J* 12,5, CH₂O), 5,14 (2H, m, parte ABq CH₂O, CHCHS), 5,72 (1H, m, NHCHCH), 7,0-7,4 (5H, m, PhCH₂), 9,12 (1H, d, *J* 8,2, NHCH), 11,95 (1H, s, CONHCO). M/z (ES-) 536 (M-1, 67%).

PREPARACIÓN DE ÁCIDO FENILACETIL-7-AMINO-3-CARBAMOILOXIMETIL-3-CEFEM-4-CARBOXÍLICO [VII]



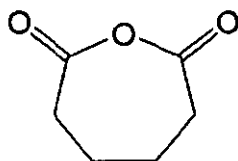
El aceite amarillo procedente de la etapa anterior se disolvió cuidadosamente mediante adición de disolución al 10% de NaHCO₃ hasta que se alcanzó un pH de aprox. 9. La disolución se agitó entonces toda la noche. Después, el pH se redujo a 2 usando HCl diluido, en cuyo momento se produjo precipitación. El precipitado se eliminó mediante filtración y se lavó con éter para dar un sólido amarillo pálido (1,81 g, 63,3% durante 2 etapas). δ_H ((CD₃)₂SO, 300 MHz) 3,4-3,65 (picos enmascarados por el pico de H₂O), 4,63 y 4,91 (2H, ABq, *J* 12,8, CH₂O), 5,10 (1H, d, *J* 4,5, CHCHS), 5,68 (1H, dd, *J* 4,5, 8,2, NHCHCH), 7,28 (5H, m, PhCH₂), 9,11 (1H, d, *J* 8,2, NHCH). δ_H ((CD₃)₂SO + D₂O, 300 MHz) 3,52 (4H, m, PhCH₂, SCH₂), 4,63 y 4,88 (2H, ABq, *J* 12,9, CH₂O), 5,05 (1H, d, *J* 4,8, CHCHS), 5,65 (1H, d, *J* 4,7, NHCHCH), 7,28 (5H, m, PhCH₂). M/z (ES-) 390 (M-1, 20%).

PREPARACIÓN DE ÁCIDO 7-AMINO-3-CARBAMOILOXIMETIL-3-CEFEM-4-CARBOXÍLICO [VIII]



Se agitó [VII] (760 mg, 1,95 mmoles) en tampón de fosfato potásico (20 ml, 0,5 M, pH 7), y el pH se elevó a pH 7,8 mediante adición de NaOH acuoso. Se añadió penicilina amidasa en perlas acrílicas (aprox. 375 mg después de lavar para eliminar el agente estabilizante de glucosa), y la suspensión resultante se agitó durante 2,5 h. Las perlas se eliminaron entonces mediante filtración, y el pH de la disolución se redujo a 3 mediante adición de HCl diluido. La disolución se enfrió entonces toda la noche a 4°C, y después se filtró para producir el producto como un polvo amarillo pálido (334 mg, 63%). δ_H ((CD₃)₂SO + D₂O, 300 MHz) 3,36 y 3,53 (2H, ABq, *J* 18,1, SCH₂), 4,60 y 4,82 (2H, ABq, *J* 12,8, CH₂O), 4,74 (1H, d, *J* 4,9, CHCHS), 4,94 (1H, d, *J* 4,9, H₂NCHCH).

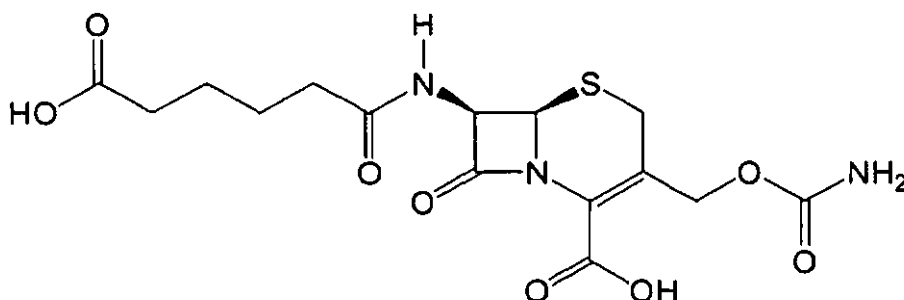
PREPARACIÓN DE ANHÍDRIDO ADÍPICO CÍCLICO [IX]



[IX]

Una mezcla de ácido adípico (5 g, 34 mmoles) y anhídrido acético (15 ml) se calentó a reflujo durante 4 h. La disolución se concentró entonces a vacío, y el residuo que queda se destiló a vacío para dar un aceite incoloro (la exposición a humedad atmosférica provoca polimerización). δ_H (CDCl₃, 300 MHz) 2,0 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂), 2,76 (4H, t, J 6,6, OCH₂CH₂CH₂CH₂O).

PREPARACIÓN DE ÁCIDO ADIPOIL-7-AMINO-3-CARBAMOILOXIMETIL-3-CEFEM-4-CARBOXÍLICO [X]



[X]

Una disolución de [VIII] (100 mg, 0,37 mmoles) en acetona acuosa (10 ml, 1:1 v/v) se ajustó a pH 8,5 mediante adición cuidadosa de NaOH acuoso. A esta disolución se añadió gota a gota a 0°C una disolución de [IX] (80 mg, 0,625 mmoles) en acetona (2 ml) con el pH mantenido entre 7,5 y 8,5 mediante adición de NaOH acuoso. La disolución resultante se agitó a 0°C durante 2 h antes de la eliminación de la acetona a vacío y el ajuste del pH a 2 mediante adición de HCl acuoso. La disolución se extrajo con ciclohexanona (2 x 20 ml), y las fases orgánicas combinadas se concentraron hasta unos pocos ml. La disolución concentrada de ciclohexanona se vertió en ciclohexano (200 ml), dando un precipitado que se recogió mediante filtración. (61 mg, 41%). δ_H ((CD₃)₂SO, 300 MHz) 1,50 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂), 2,22 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂), 3,45 y 3,59 (2H, ABq, J 18,1, SCH₂), 4,62 y 4,90 (2H, ABq, J 12,9, CH₂O), 5,10 (1H, d, J 4,8, CHCHS), 5,67 (1H, dd, J 4,8, 8,2, NHCHCH), 8,82 (1H, d, J 8,2, NHCH).

Ejemplo 4

Producción *in vitro* de ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico usando bioconversión

Preparación de extracto libre de células

El gen *cmcH* de *Streptomyces clavuligerus* se expresó en XL1-Blue de *E. coli* bajo el control del promotor *lac* usando el plásmido pGK105 (Figura 11). Para la expresión del gen *cmcH*, se inocularon 5 ml de medio de crecimiento LB que contiene cloranfenicol con una sola colonia de XL1-Blue:pGK105, y se hizo crecer a 37°C durante 16 horas con agitación a 250 rpm. Este cultivo se usó como un inóculo al 1% para un matraz que contiene 100 ml de medio LB estéril suplementado con cloranfenicol, que entonces se incubó a 27°C con agitación a 250 rpm y buena aireación hasta que la OD₆₀₀ alcanzó 0,4-0,6. Entonces se añadió IPTG al cultivo hasta una concentración final de 0,3 mM, y el crecimiento se continuó durante otras 16 horas. Las células se cosecharon mediante centrifugación (4000 g, 20 min., 4°C), y el pelete celular se resuspendió en 5 ml de tampón (20 mM de Tris.HCl, 200 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, pH 7) y se congeló a -80°C durante 1 hora, o a menos -20°C toda la noche. Después de descongelar en un baño de hielo y agua, la suspensión celular se sometió a ultrasonidos (MSE Soniprep 150). 15-20 ciclos de ultrasonidos durante 10 s, cada uno seguido de 10 segundos de tiempo de enfriamiento, fueron suficientes para completar la lisis según se monitorizó mediante la liberación de proteína soluble usando el ensayo de Bradford. El desecho celular, la proteína insoluble y las células no lisadas se peletizaron mediante centrifugación (4000 g, 60 min., 4°C). El sobrenadante se trató con clavulanato de potasio (5 mgml⁻¹) durante 1 hora a 27°C para inactivar cualesquiera β -lactamasas codificadas cromosómicamente. El exceso de clavulanato se eliminó mediante filtración en gel sobre Sephadex G-25® usando columnas de desalificación PD-10, y la disolución de enzima resultante se usó inmediatamente o se almacenó a -20°C hasta que se necesitó.

Ensayo de carbamoil transferasa

Se llevaron a cabo ensayos (100 μ l) a 28°C durante cuatro horas y que contenían ácido adipoil-desacetilcefalosporánico (1-5 mM), MgSO₄ (0,8 mM), MnCl₂ (1 mM), imidazol (100 mM), ATP (5,4 mM), fosfato de

carbamoilo (9,8 mM), pH 6,75-7. La cantidad de proteína usada osciló desde 10 µg hasta 250 µg. La disolución de enzima se descongeló en hielo antes de añadirla a la mezcla de reacción, que se dejó que alcanzara 28°C en un bloque calefactor. La reacción se terminó mediante adición de metanol enfriado en hielo (100 µl), y se mezcló antes de la centrifugación (10000 g, 5 min., 4°C) para peletizar la proteína precipitada. La proteína soluble que se había desnaturalizado mediante tratamiento térmico a 100°C durante 5 min. se usó en una reacción de control que siempre se llevó a cabo a lo largo de ensayos normales.

Análisis de HPLC/MS

La separación de los componentes de la reacción se logró en una columna C18 analítica Spherisorb (250 x 4,6 mm) a RT usando un sistema de HPLC Gilson con una fase móvil que consiste en 0,1 M de dihidrogenofosfato de sodio como tampón A y 0,05 M de dihidrogenofosfato de sodio/50% de acetonitrilo como tampón B, un caudal de 1 ml/min.⁻¹ y monitorización a 254 nm. Usando estas condiciones, los patrones auténticos del material de partida de cefalosporina y el producto tuvieron tiempos de retención de 19 min. y 22,5 min., respectivamente. Los picos del producto procedentes de varios experimentos analíticos se reunieron, se acidificaron hasta pH 1,8 y se extrajeron con ciclohexanona. La fase orgánica se extrajo entonces nuevamente con agua con el pH de la mezcla de extracción bifásica ajustado a 7 en agitación periódica. La fase acuosa se liofilizó, se volvió a disolver en agua y se analizó mediante MS con ionización por electropulverización (modo de ion negativo), y el producto cefalosporínico carbamoilado se identificó a partir de su característico $[M - H]^-$ (Figura 12).

Conclusión

A partir de este experimento, se puede concluir que el ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico se puede producir usando bioconversión.

Ejemplo 5

Exportación extracelular de ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico

Las muestras como se preparan según el Ejemplo 2 se analizaron con más detalle separando la biomasa del filtrado. Después de 168 horas de crecimiento a 25 grados Celsius y 280 rotaciones por minuto, los filtrados de cultivos que habían crecido en pocillos se separaron de la biomasa vía filtración, y se analizaron mediante RMN. La biomasa se lavó dos veces con disolución salina fisiológica enfriada con hielo (0,9 mM de NaCl), se congeló en nitrógeno líquido, se liofilizó, se resuspendió en agua, y también se analizó mediante RMN. Además del ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico, las cepas también producen intermedios, respectivamente IPN, 6APA, ad6APA, ad7ADCA y adAHCA (= adADAC). Sin embargo, el ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico es la única β-lactama segregada exclusivamente.

Los resultados de estos experimentos se resumen en la Figura 13 (A y B).

Ejemplo 6

Producción fermentativa de ácido fenoxiacetoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico

Los transformantes de *P. chrysogenum* obtenidos según el Ejemplo 1 se inocularon en medio de ensayo de producción como se describe en el ejemplo 2, pero en lugar de acetato de sodio se suplementó con fenoxiacetato de potasio 5 mg/ml como precursor de cadena lateral para ensayos de producción (pH antes de la filtración 6,0). El tiempo de cultivo fue 168 horas a 25 grados Celsius y 280 rotaciones por minuto.

Los filtrados de cultivos que se hicieron crecer en pocillos se separaron de la biomasa y se analizaron mediante RMN. La biomasa se lavó dos veces con disolución salina fisiológica enfriada con hielo (0,9 mM de NaCl), se congeló en nitrógeno líquido, se liofilizó, se resuspendió en agua, y también se analizó mediante RMN. Se observó ácido fenoxiacetoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico en las fracciones miceliales.

Ejemplo 7

Producción fermentativa de ácido transhidromuconoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico

Los transformantes de *P. chrysogenum* obtenidos según el Ejemplo 1 se inocularon en medio de ensayo de producción como se describe en el ejemplo 2, pero en lugar de acetato de sodio se suplementó con ácido transhidromucónico 4 mg/ml como precursor de cadena lateral para ensayos de producción (pH antes de la filtración 6,0). El tiempo de cultivo fue 168 horas a 25 grados Celsius y 280 rotaciones por minuto.

Los filtrados de cultivos que se hicieron crecer en pocillos se separaron de la biomasa y se analizaron mediante RMN. La biomasa se lavó dos veces con disolución salina fisiológica enfriada con hielo (0,9 mM de NaCl), se congeló en nitrógeno líquido, se liofilizó, se resuspendió en agua, y también se analizó mediante RMN. Se observó ácido transhidromuconoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico en las fracciones miceliales.

Ejemplo 8

Producción fermentativa de ácido aminoadipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico

Los transformantes de *P. chrysogenum* obtenidos según el Ejemplo 1 se inocularon en medio de ensayo de producción como se describe en el ejemplo 2, pero sin ningún precursor de cadena lateral adicional. El tiempo de cultivo fue 168 horas a 25°C Celsius y 280 rotaciones por minuto.

- 5 Los filtrados de cultivos que se hicieron crecer en pocillos se separaron de la biomasa y se analizaron mediante RMN. La biomasa se lavó dos veces con disolución salina fisiológica enfriada con hielo (0,9 mM de NaCl), se congeló en nitrógeno líquido, se liofilizó, se resuspendió en agua, y también se analizó mediante RMN. Se observó ácido aminoadipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico en ambas fracciones.

Ejemplo 9

- 10 Bioactividad del ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico

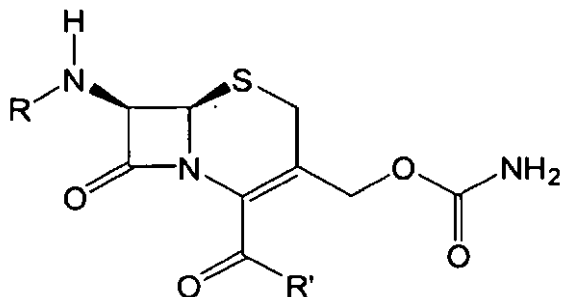
- El ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico, preparado según el Ejemplo 3, se usó para evaluar su actividad frente a diferentes bacterias. Las bacterias usadas fueron: *Escherichia coli* ESS, *Micrococcus luteus* DSM 348 [Andrade, A.C., Van Nistelrooy, J.G.M., Peery, R.B., Skatrud, P.L., De Waard, M.A., 2000, The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production] y *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Las bacterias se hicieron crecer toda la noche en 2 x TY líquido a 37 grados y 280 rotaciones por minuto, y se diluyeron subsiguientemente 1000 veces en medio reciente. Se inocularon dos ml de placas de microtitulación de pocillos profundos con 1 ml de los cultivos bacterianos diluidos, y se añadieron diferentes concentraciones de ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico (adipoil-ACCA o Ad-ACCA) a pocillos individuales. Como control, se usaron otras b-lactamas activas y menos activas: 6-APA, Adipoil-6-APA, 7-ADCA, adipoil-7-ADCA, 7-ACA, cefalosporina C y cefuroxima. Las placas de microtitulación se incubaron durante 2 días a 25 grados Celsius y 550 rotaciones por minuto.

- Los resultados para la inhibición del crecimiento por adipoil-7-ADCA, adipoil-ACCA y cefuroxima se resumen en las Figuras 14 (*B. subtilis*), 15 (*E. coli*) y 16 (*M. luteus*).

- Las concentraciones inhibitoras mínimas de ácido adipoil-7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico para *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ESS y *M. luteus* DSM 348 fueron 4, 7 y 7 µM, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de cef-3-em caracterizado por la fórmula [I]



[I]

o una sal o éster del mismo,

5 en el que R se selecciona del grupo que consiste en

a) HOOC-X-CO-

en el que X se define como $(\text{CH}_2)_4$

o en el que X es $(\text{CH}_2)_m\text{-CH=A-(CH}_2)_n$ o $(\text{CH}_2)_m\text{-C}\equiv\text{C-(CH}_2)_n$, en el que m y n son cada uno individualmente 0, 1, 2 ó 3, y $m + n = 2$ ó 3, y A es CH o N,

10 o en el que X es $(\text{CH}_2)_p\text{-CH=CH-CH=C-(CH}_2)_q$, en el que p y q son cada uno individualmente 0 ó 1, y $p + q = 0$, o

b) $\text{Y-CH}_2\text{-CO-}$, en el que Y es fenilo, fenoxi o tetrazolilo

y en el que R' se selecciona del grupo que consiste en

c) OH

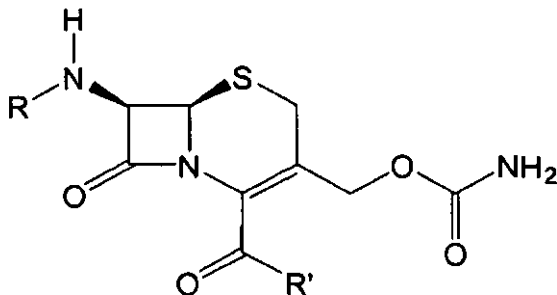
15 d) O-(alquilo de C1-6), en el que el alquilo puede ser lineal o ramificado, y

e) O-C(alquilo de C1-6)-O-(alquilo de C1-6), en el que los grupos alquilo pueden ser lineales o ramificados.

2. Compuesto según la reivindicación 1 o una sal o éster del mismo, en el que el grupo R' es OH, y en el que el grupo R se selecciona de adipoilo, fenoxiacetilo y tetrazolacetilo.

20 3. Ácido adipoil-7-amino-3-carbamiloiximetil-3-cefem-4-carboxílico según la reivindicación 1, o una sal o éster del mismo.

4. Un bioprocedimiento para la producción fermentativa de un compuesto de cef-3-em, caracterizado por la fórmula [I]:



[I]

o una sal o éster del mismo, en el que R se selecciona del grupo que consiste en

25 a. HOOC-X-CO-

en el que X se define como $(\text{CH}_2)_4$

o en el que X es $(\text{CH}_2)_m\text{-CH=A-(CH}_2)_n$ o $(\text{CH}_2)_m\text{-C}\equiv\text{C-(CH}_2)_n$, en el que m y n son cada uno individualmente 0, 1, 2 ó 3, y $m + n = 2$ ó 3, y A es CH o N,

o en el que X es $(CH_2)_p-CH=CH-CH=C-(CH_2)_q$, en el que p y q son cada uno individualmente 0 ó 1, y $p + q = 0$, o

b. $Y-CH_2-CO-$, en el que Y es fenilo, fenoxi o tetrazolilo

y en el que R' se selecciona del grupo que consiste en

5

c. OH

d. O-(alquilo de C1-6), en el que el alquilo puede ser lineal o ramificado, y

e. O-C(alquilo de C1-6)-O-(alquilo de C1-6), en el que los grupos alquilo pueden ser lineales o ramificados,

que comprende las etapas de:

10

A) mantener, en un medio de cultivo capaz de sostener su crecimiento, una cepa de *P. chrysogenum* que produce isopenicilina N y añadir a dicho medio de cultivo una materia prima que comprende uno cualquiera o más precursores de cadena lateral seleccionados del grupo que consiste en

- $Y-CH_2-COOH$, o una sal o éster del mismo, en el que Y es fenilo, fenoxi o tetrazolilo,

- un compuesto de la fórmula general $HOOC-X-COOH$, o una sal o éster del mismo, en el que X se define como $(CH_2)_4$

15

- o en el que X es $(CH_2)_m-CH=A-(CH_2)_n$ o $(CH_2)_m-C\equiv C-(CH_2)_n$, en el que m y n son cada uno individualmente 0, 1, 2 ó 3, y $m + n = 2$ ó 3, y A es CH o N,

- o en el que X es $(CH_2)_p-CH=CH-CH=C-(CH_2)_q$, en el que p y q son cada uno individualmente 0 ó 1, y $p + q = 0$ ó 1

20

que son capaces de ser asimilados y utilizados por dicha cepa de *P. chrysogenum* para producir el ácido acil-6-aminopenicilánico (acil-6-APA) correspondiente, con lo que se produce dicho acil-6-APA;

B) llevar a cabo la siguiente conversión enzimática mediante la expresión *in situ* de los genes correspondientes:

25

i) el acil-6-APA se expande anularmente *in situ* para formar el ácido acil-7-amino-desacetoxicefalosporánico (acil-7-ADCA) correspondiente mediante la enzima expandasa, en el que dicha cepa de *P. chrysogenum* se ha transformado mediante ADN que codifica la enzima expandasa capaz de aceptar como sustrato dicho acil-6-APA, con lo que, como resultado de su expresión, dicho acil-6-APA producido por dicha cepa es también después expandido anularmente *in situ* para formar el acil-7-ADCA correspondiente;

30

ii) la cadena lateral 3-metilica de dicho acil-7-ADCA es hidroxilada *in situ* para producir el acil-7-amino-desalquilcefalosporánico (acil-7-ADAC) correspondiente mediante la enzima hidroxilasa, en el que dicha cepa de *P. chrysogenum* se ha transformado mediante ADN que codifica la enzima hidroxilasa capaz de aceptar como sustrato dicho acil-7-ADCA, con lo que, como resultado de su expresión, dicho acil-7-ADCA producido por dicha cepa es también después hidroxilado *in situ* para formar el acil-7-ADAC correspondiente;

35

iii) la cadena lateral 3-hidroximetilica de dicho acil-7-ADAC es O-carbamoilada *in situ* para producir el compuesto según la fórmula [I] mediante la enzima O-carbamoil transferasa, en el que dicha cepa de *P. chrysogenum* se ha transformado mediante ADN que codifica la enzima O-carbamoil transferasa capaz de aceptar como sustrato dicho acil-7-ADAC, con lo que, como resultado de su expresión, dicho acil-7-ADAC producido por dicha cepa es también después carbamoilado *in situ* para formar un compuesto según la presente invención.

40

5. Uso de un compuesto según la reivindicación 1, en la producción de un antibiótico de cef-3-em.

6. Uso del compuesto según la reivindicación 1, en la producción de un antibiótico de 3-carbamoiloximetil-3-cefem.

7. Uso según la reivindicación 6, en el que el antibiótico de 3-carbamoiloximetil-3-cefem se selecciona del grupo que consiste en:

45

a. Cefuroxima,

b. Cefoxitina

c. Cefcapeno pivoxilo.

8. Uso del compuesto según la reivindicación 1, en la producción de ácido 7-amino-3-carbamoiloximetil-3-cefem-4-carboxílico o una sal o éster del mismo.

9. Microorganismo de la especie *P. chrysogenum* capaz de producir isopenicilina N y adecuado para la producción de los compuestos según las reivindicaciones 1-3, y que se ha proporcionado con fragmentos de ADN que codifican:

- 5
- a. una enzima expandasa
 - b. una enzima hidroxilasa
 - c. una enzima O-carbamoil transferasa.

10. Microorganismo de la especie *P. chrysogenum* capaz de producir isopenicilina N y adecuado para la producción de los compuestos según las reivindicaciones 1-3, y que se ha proporcionado con fragmentos de ADN que codifican:

- 10
- a. una enzima expandasa/hidroxilasa combinada
 - b. una enzima O-carbamoil transferasa.

Fig. 1

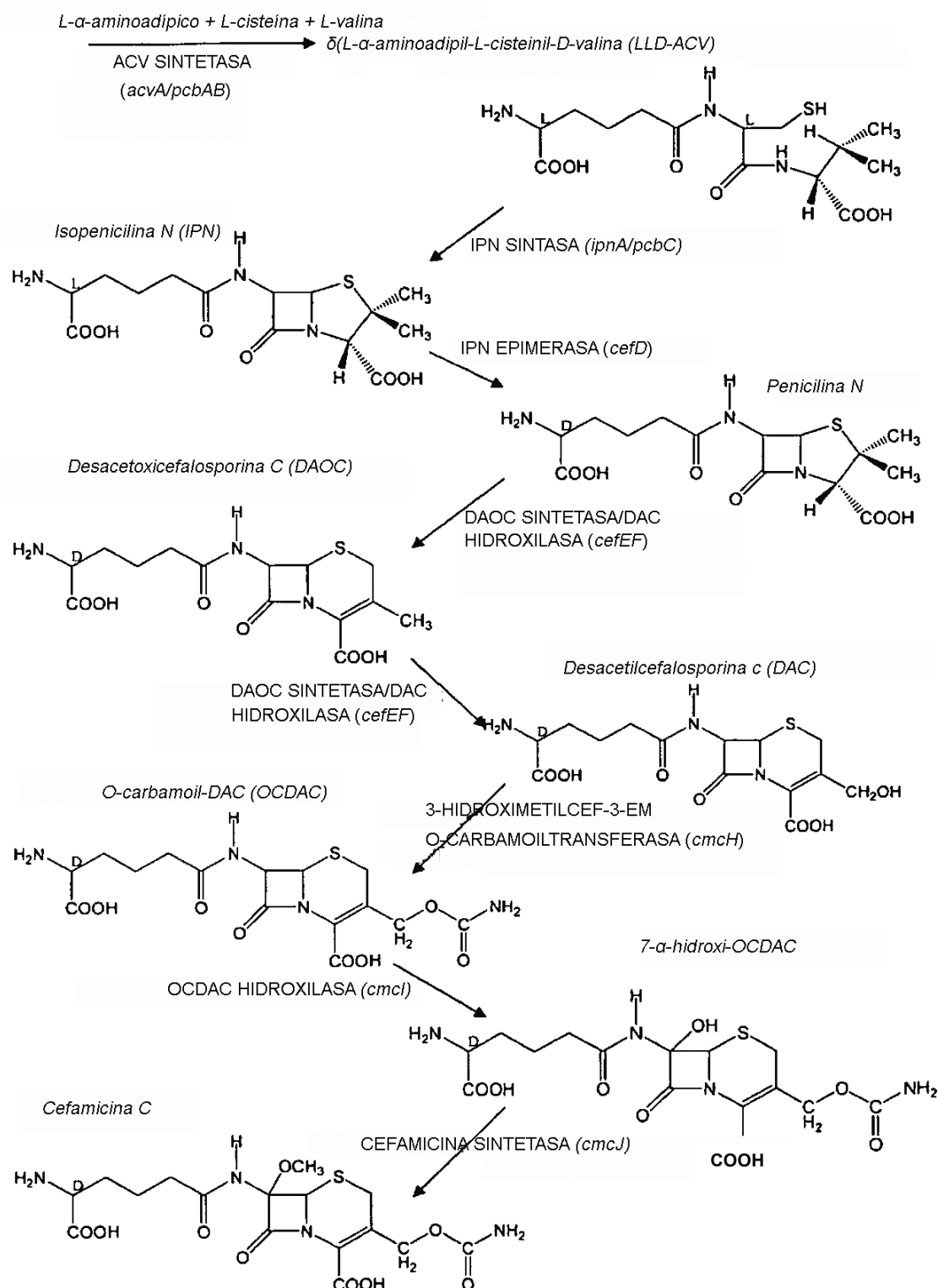


Fig. 2

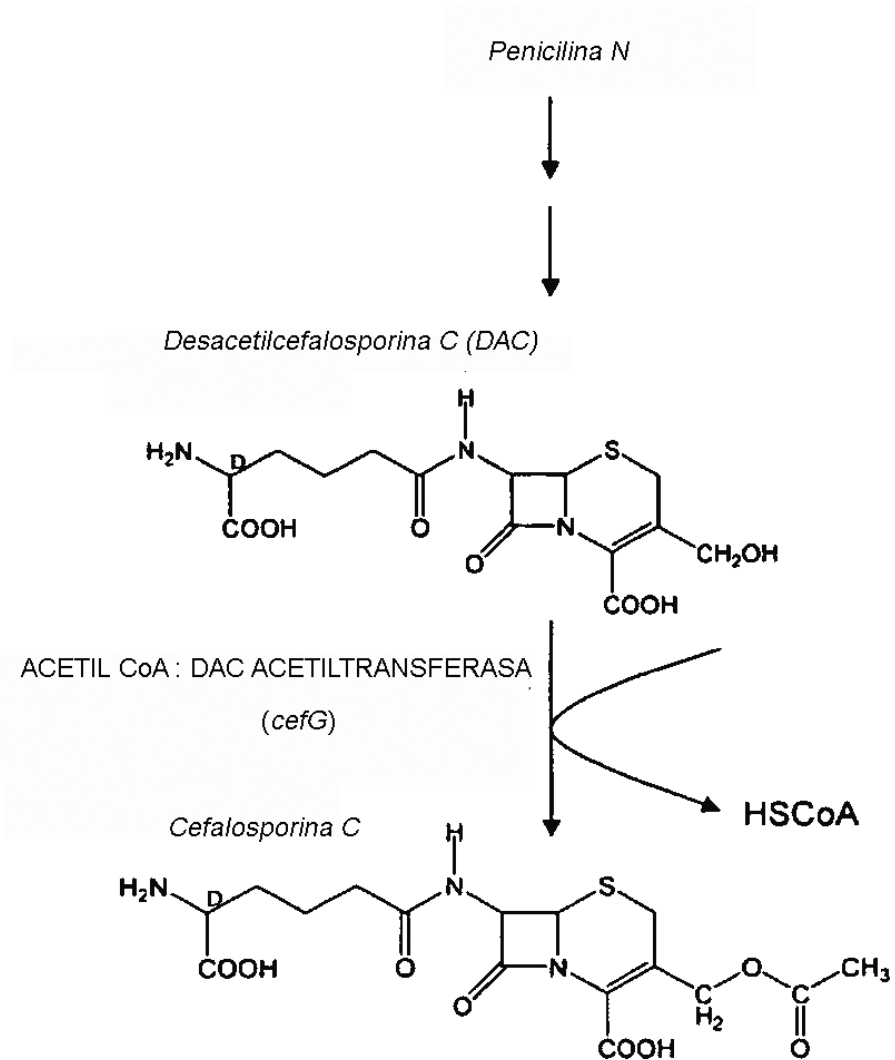


Fig. 3

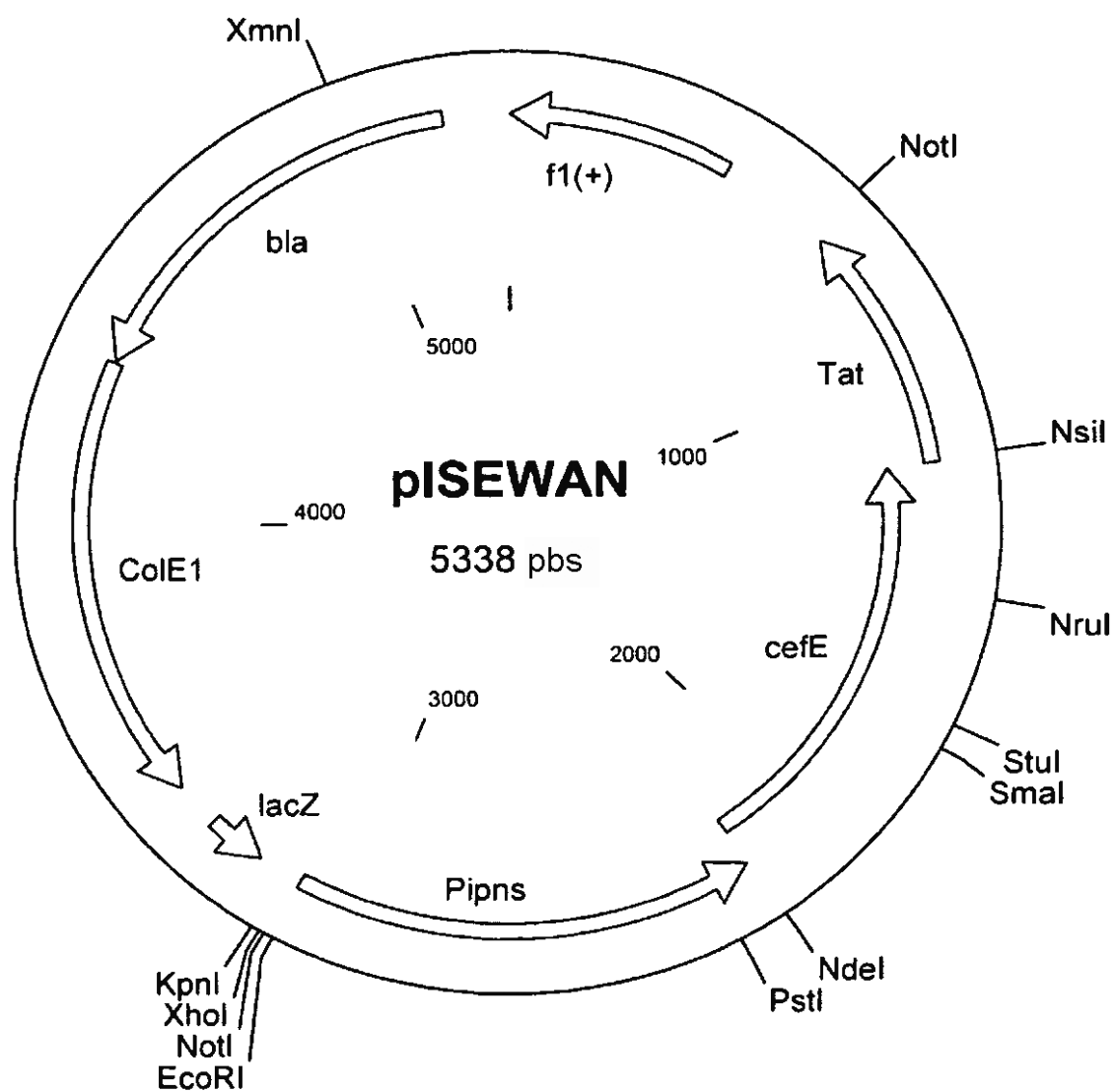


Fig. 4

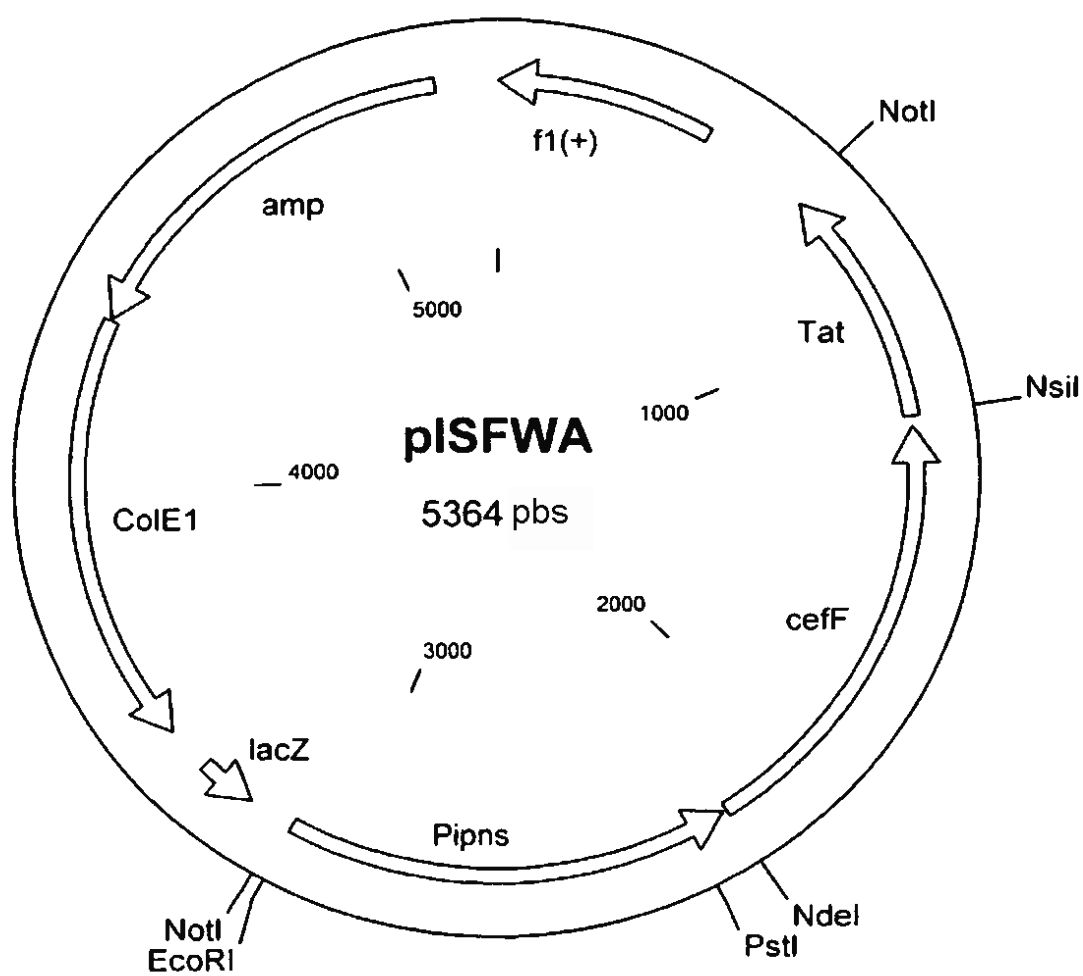


Fig. 5

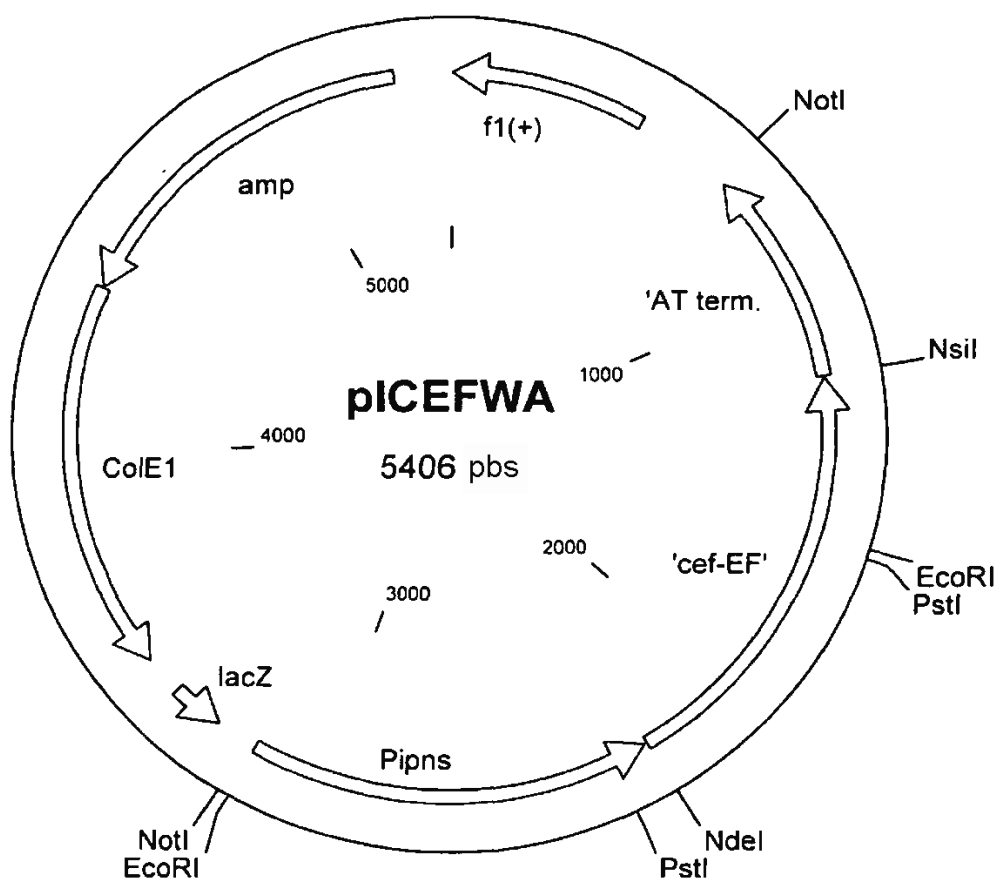


Fig. 6

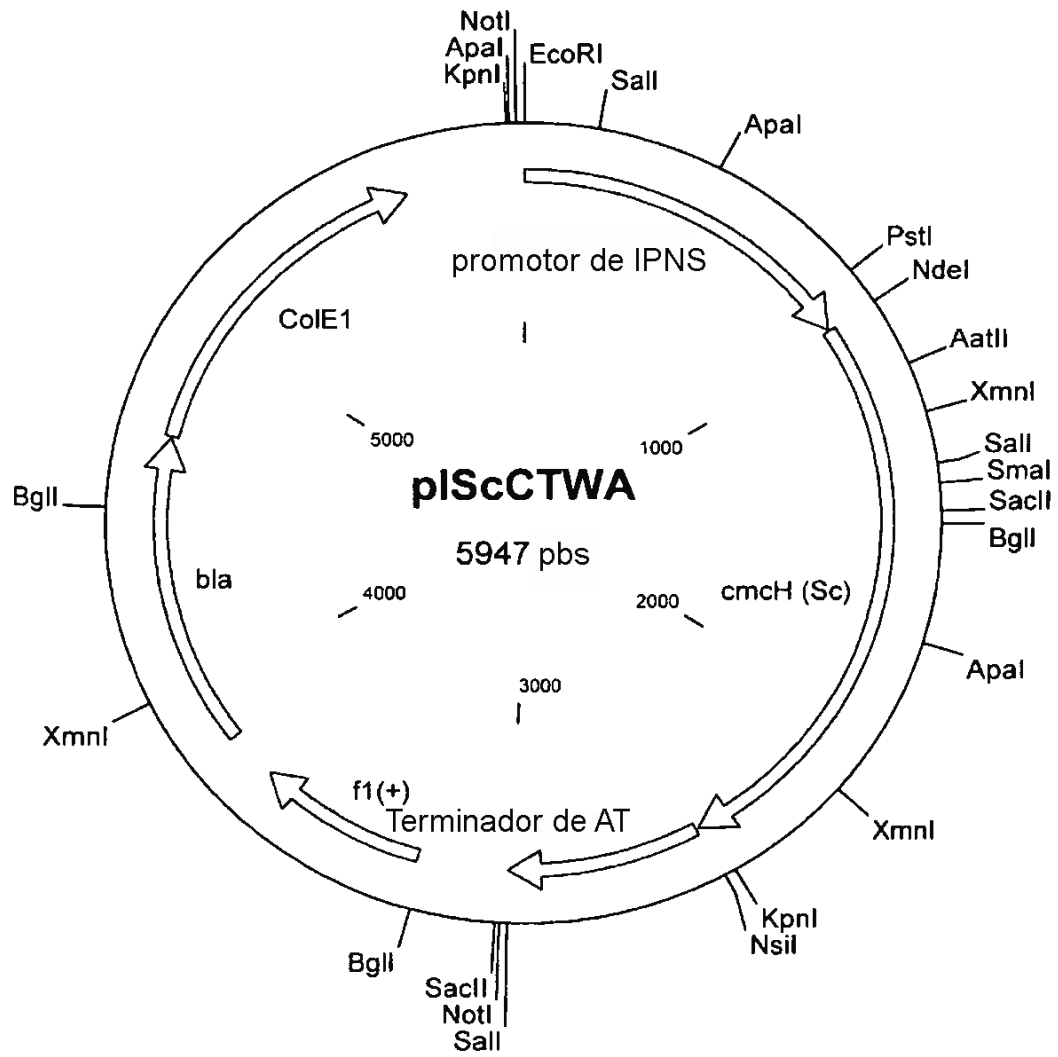


Fig. 7

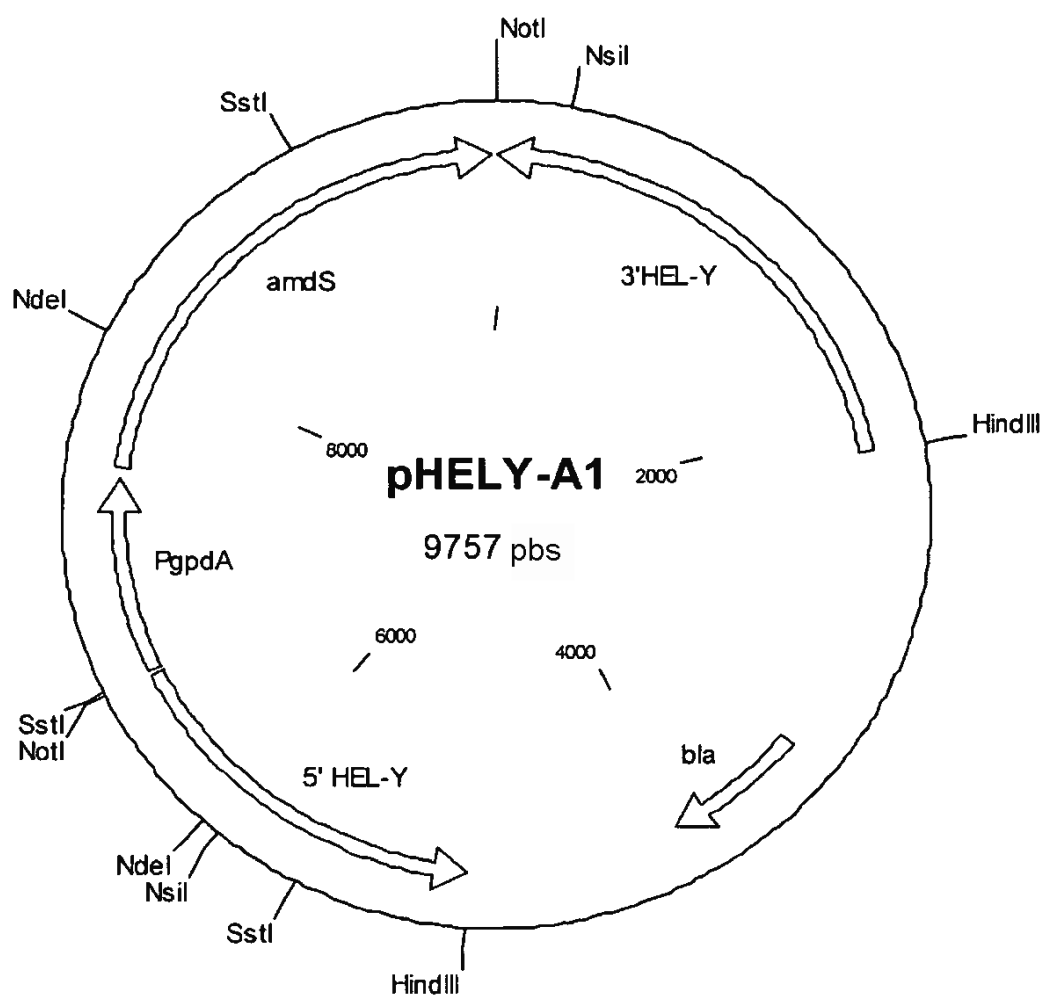


Fig. 8

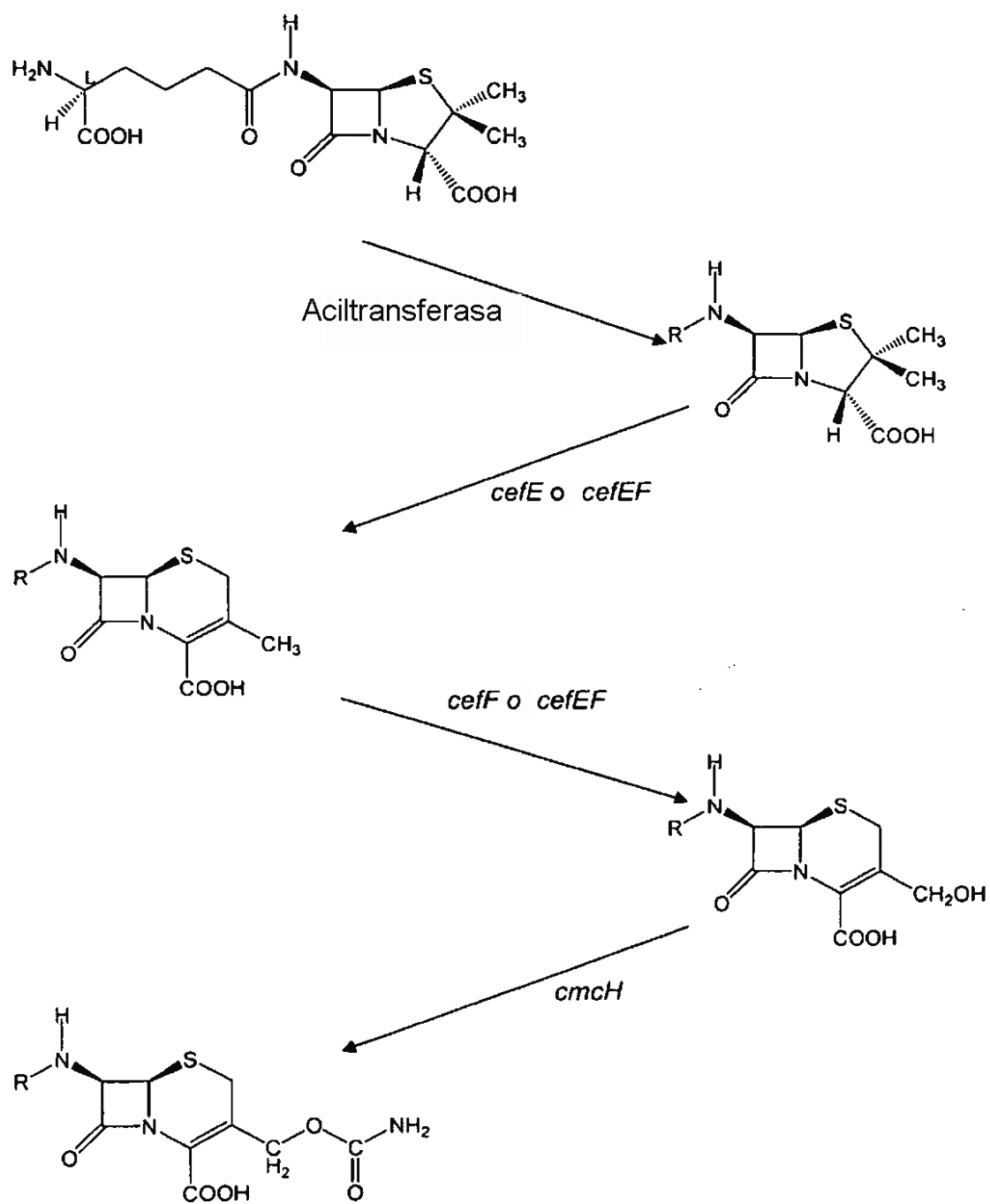


Figura 9

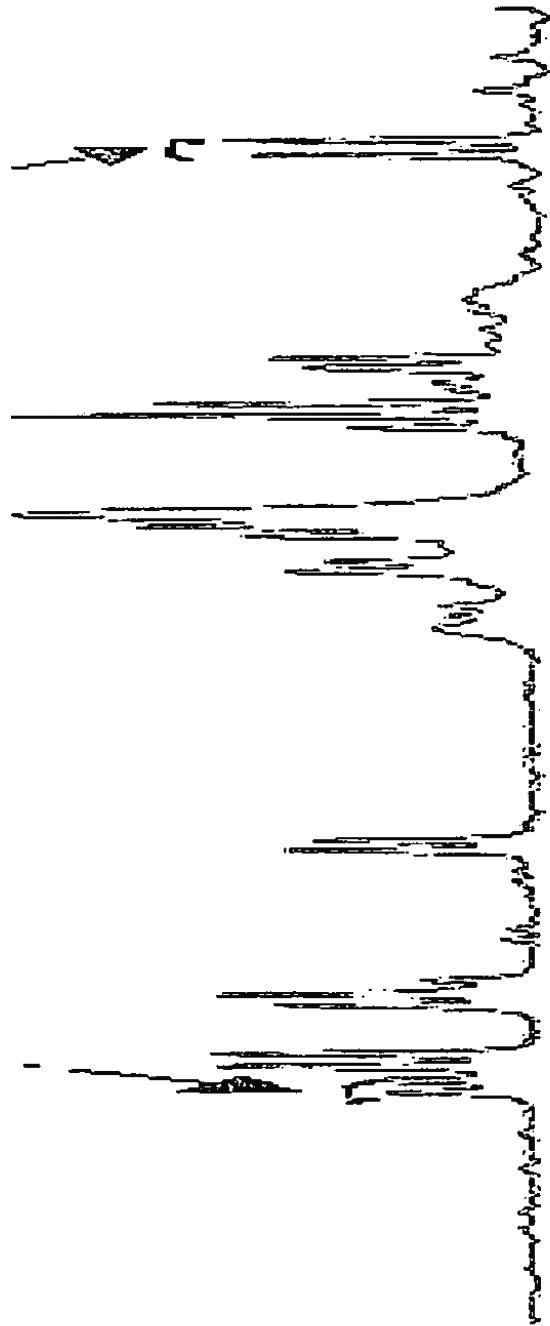


Figura 10

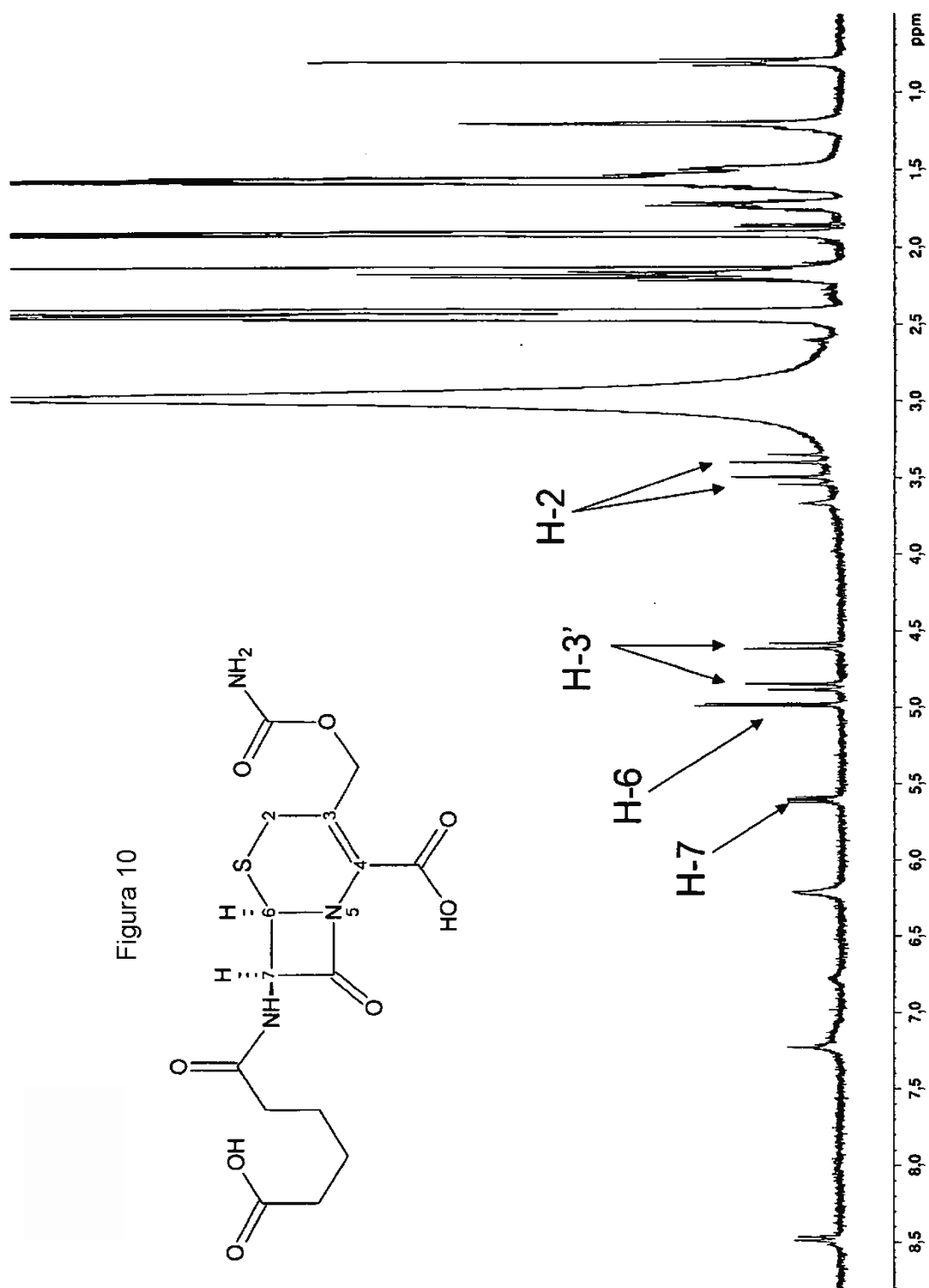


Figura 11

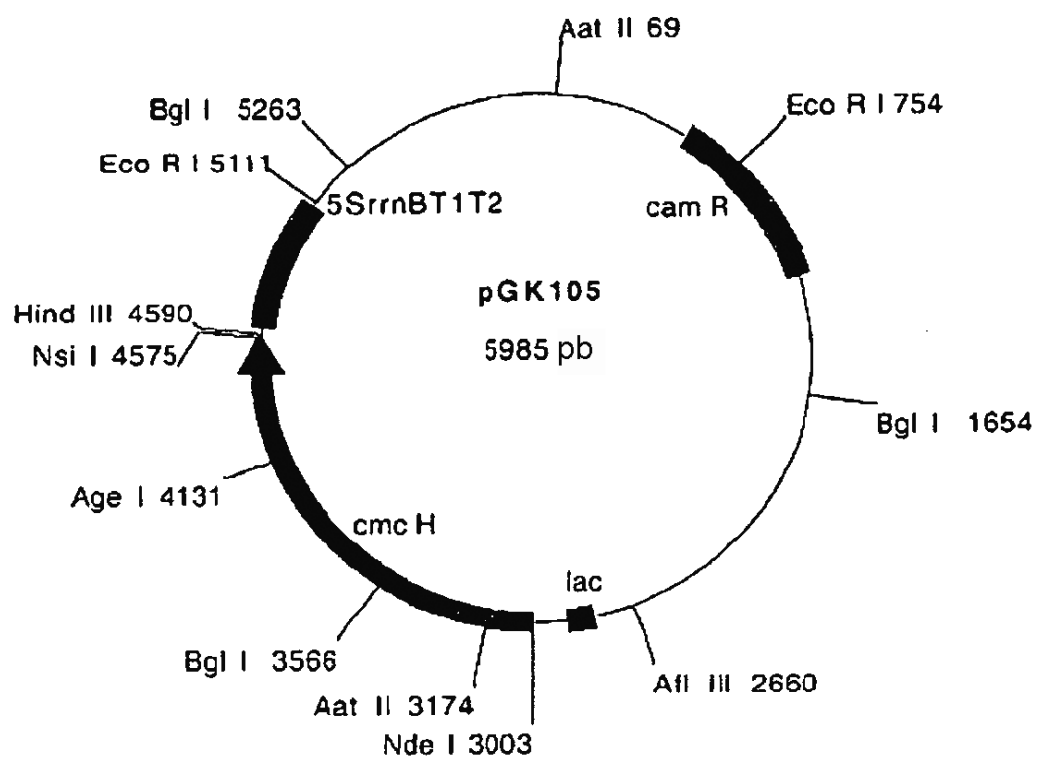


Figura 12

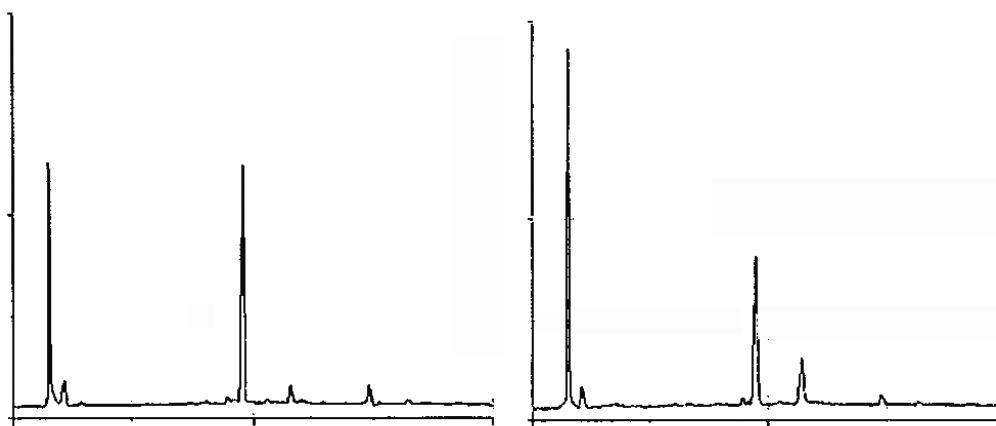


Figura 13

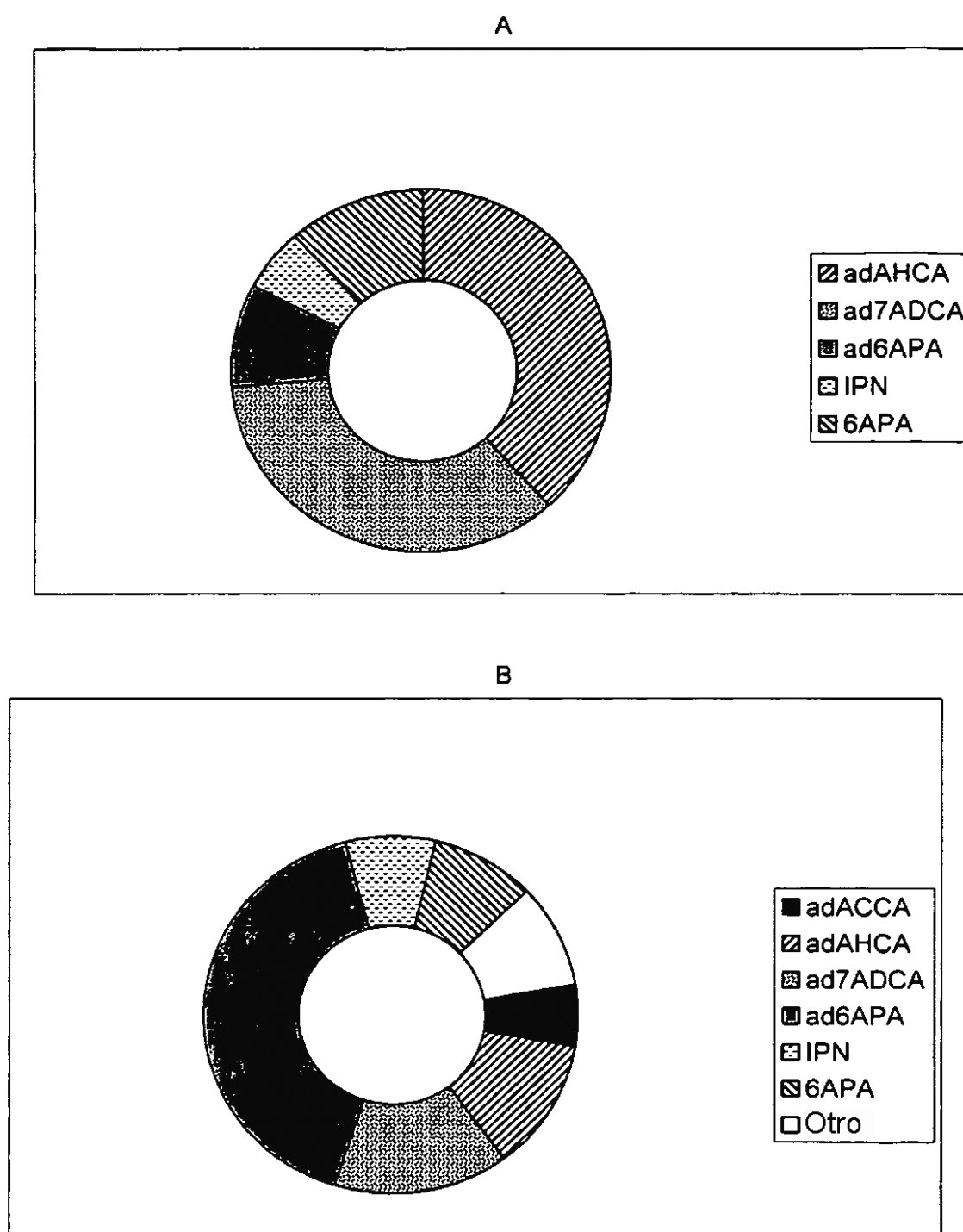


Figura 14

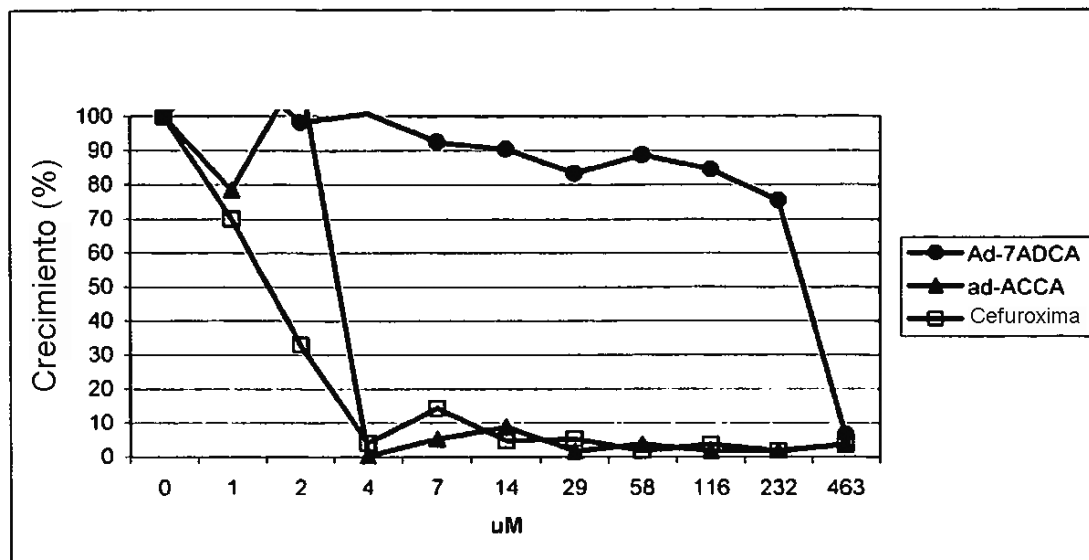


Figura 15

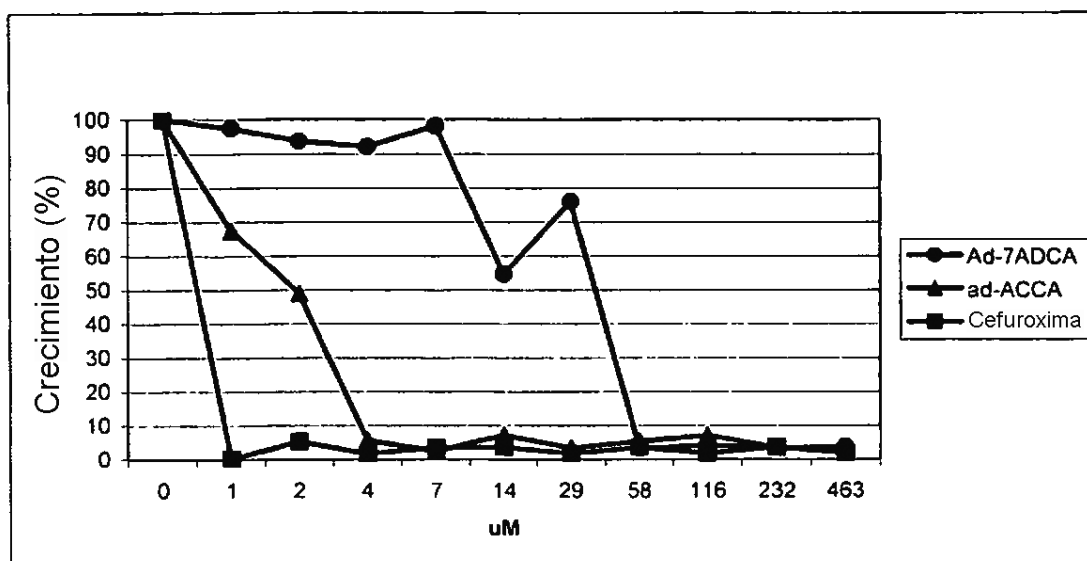


Figura 16

