

347919

PATENTE DE INVENCION

Case 6067  
=====



## *Memoria Descriptiva*

*sobre:*

"Procedimiento para el aislamiento de la cefaloesporina C".

-----

*Solicitante:* CIBA SOCIETE ANONYME, entidad suiza, residente en Basilea, Suiza.

-----

El objeto de la presente invención es un nuevo procedimiento para el aislamiento de la cefaloesporina C en forma de un derivado de soluciones diluídas que contienen cefaloesporina C, especialmente de las soluciones que contienen la cefaloespo-

5.



rina C en mezcla con otras sustancias, ante todo de un líquido de cultivo que contiene cefaloesporina - C.

- El aislamiento de la cefaloesporina C de soluciones acuosas "impurificadas" con otras sustancias solubles en agua, especialmente de caldos de cultivo, es complicado y ofrece dificultades ante todo en la realización en escala técnica, ya que la cefaloesporina C es, por una parte, muy sensible y, por otra parte se ha de separar de otras sustancias que en parte muestran propiedades físicas y químicas parecidas.
- 5.
- 10.

- Como procedimiento para el aislamiento de la cefaloesporina C de las soluciones de fermentación se ha propuesto por ejemplo absorber la cefaloesporina C en carbón activo, eluir, absorber el material eluido en óxido de aluminio, volver a eluir, absorber en una resina intercambiadores de aniones, eluir la cefaloesporina C en bruto en una solución - tampón del pH 2,5 hasta 8,0, por ejemplo acetato de piridina, y someter esta entonces a un proceso de extracción con disolventes, véase la patente alemana - 1.014.711. Según otro procedimiento se debe obtener la cefaloesporina C mediante fraccionación de disolventes, especialmente entre agua y fenol o fenoles - alquilo-sustituídos. Como ulterior posibilidad se propuso exponer los eluados de la columna de carbón activo o de la columna de óxido de aluminio o de la columna de intercambiadores de iones a tales condiciones con respecto a temperatura y acidez de mane-
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



- ra que la cefaloesporina N contenida en el filtrado de cultivo se transforme en ácido penicilínico, la cefaloesporina C por el contrario quede prácticamente libre de influenciación alguna, o destruir la cefaloesporina N bajo los efectos de picilinasis y separar entonces la cefaloesporina mediante extracción fraccionada con disolventes o mediante cromatografía con una resina intercambiadora de iones. También se ha intentado absorber la cefaloesporina C de un agente tratado con ácido directamente con un intercambiador de iones. Esta absorción directa tenía sin embargo las desventajas de que debido a la presencia de otros aniones además de la cefaloesporina C se necesitaban grandes cantidades de resina intercambiadora de aniones y además se eluían simultáneamente los iones de cloruro y causaban dificultades en las ulteriores etapas del procedimiento. Finalmente se ha descrito un procedimiento en el que el agente de fermentación clarificado se ajustaba con un intercambiador de cationes conteniendo grupos fuertemente ácidos en la forma  $H^+$  a un pH de 2,8 hasta 4,0, se separaba el intercambiador de cationes del agente acidificado y este se liberaba por un fuerte intercambiador de aniones en la forma de una sal con un ácido orgánico monobásico, débil, volátil, de prácticamente todos los iones de cloruro y otros aniones inorgánicos y finalmente se obtenía la cefaloesporina C del percolato, por ejemplo mediante absorción en un intercambiador de aniones en forma de acetato y elución con tampón de acetato de piridina (véase la patente alemana -
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



1.126.564). Los procedimientos en los cuales la cefaloesporina C es absorbida en intercambiadores de iones tienen la desventaja de que así se destruye una gran parte de la cefaloesporina C.

5. Se ha descubierto ahora un proceso ventajoso en el que la cefaloesporina se aísla de una solución acuosa diluída, especialmente de un líquido de fermentación, en forma de un derivado que es especialmente adecuado para la ulterior elaboración
10. a compuestos antibacteriales de alta eficacia que se derivan del ácido 7-amino-cefaloesporaico, por ejemplo el ácido 7-fenilacetilamino-cefaloesporaico o el ácido 7-tienolacetilamino-cefaloesporaico. El procedimiento se caracteriza porque en una solución acuosa
15. que contiene defaloesporina C mediante reacción con ácido N-trinitrobencenosulfóico se forma la N-trinitrofenil-cefaloesporina C y esta se separa de la solución.

20. El procedimiento se puede emplear también para la limpieza de la cefaloesporina C en bruto disolviendo el producto en bruto en agua o en otro disolvente y tratando la solución como se ha mencionado. Además se puede emplear el procedimiento también para limpiar los derivados de la cefaloesporina
25. C que muestran un radical amino libre en la cadena lateral, por ejemplo de los ésteres de la cefaloesporina C.

30. Cuando el nuevo procedimiento se emplea para el aislamiento de la cefaloesporina C contenida en los líquidos de fermentación se puede -





- ésteres de alquilo inferior de ácidos alcano inferior, tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido - butírico, por ejemplo acetato de etilo, acetato de - butilo, o con una cetona no miscible con agua, espe-  
5. cialmente di-alquilo inferior-cetona, por ejemplo die- tilcetona, metilisobutilcetona, o un hidrocarburo sin sustituir o sustituido, especialmente clorado, por - ejemplo un alcano clorado, tal como cloruro metilénico, cloroformo, cloruro etilénico, o mezclas de estos  
10. disolventes. Además se puede extraer con intercambiadores de iones básicos líquidos en los disolventes o mezclas de disolventes mencionados, por ejemplo con Amberlite LA-2 en acetato de n-butilo o en 2-etil- n-butanol.
15. En lugar de extraer la trinitro- fenil-cefaloesporina se puede precipitar también de la solución, por ejemplo ajustando el pH a 1-3, pre- ferentemente a 1,8 - 2.
20. Para la transformación de la trini- trofenil-cefaloesporina C en el ácido 7-amino-cefalo- esporáico se puede estrificar el compuesto y trans- formar, por ejemplo según el procedimiento descrito en la patente inglesa 1.041.989 en el 7-ACA.
25. La invención se describe en los - ejemplos siguientes. Las temperaturas están indica- das en grados centígrados.
- Ejemplo 1
30. 370 litros de caldo de cultivo - conteniendo cefaloesporina C se mezclan con una solu- ción de 2,72 kg de ácido oxálico en 10 litros de -



- agua y 0,9 litros de una mezcla de partes iguales de agua y ácido sulfúrico concentrado, de manera que resulte un pH de 3. Después de agregar 8 kg de "Celatom" (tierra de diatomeos) como agente auxiliar de filtración se filtra a través de una prensa filtrante. El filtrado claro (320 litros) contiene 1,57 g de cefaloesporina C por litro. El residuo de filtración húmedo (62 kg) se desecha.
5. El filtrado se añade a una solución de 920 g de sodio 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico del pH 7,5 que se obtiene si 796 g de sulfito sódico se disuelven en 3,35 litros de agua desionizada, se agrega 1 kg de hielo y en el plazo de 15 minutos se agrega agitando una solución de 1,425 kg de cloruro picrílico en 4,35 litros de acetona. El pH de la mezcla de solución se ajusta con sosa cáustica concentrada bajo agitación a 9,0 y después se mantiene durante 4 horas a una temperatura de 26° a 8,5 - 8,7.
10. La solución de reacción rojo claro, que contiene la 2,4,6-trinitrofenil-cefaloesporina C se extrae a un pH de 1,5 hasta 2,0 que se obtiene con solución 5N de ácido sulfúrico, mediante un extractor de contracorriente con metilisobutilcetona. Se obtienen 190 litros de extracto de metilisobutilcetona. Este se extrae mediante un extractor de contracorrientes con tampón de fosfato 0,2-M del pH 8. Se obtienen 95 litros de extracto acuoso del pH 6. De este se extrae nuevamente la 2,4,6-trinitrofenil-cefaloesporina C con metilisobutilcetona a un pH 2. Los 50 litros de solución orgánica obtenidos se extraen a un pH de 6
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



- tres veces, cada una con 4 litros de agua. El extrac-  
to acuoso así obtenido (12 litros) se enfría a 0 has-  
ta 4<sup>o</sup>, se ajusta con solución 6N de ácido clorhídri-  
co a un pH 2,0 el precipitado se aspira y se lava con  
5. agua fría como el hielo. Después de secar quedan 751  
g de 2,4,6-trinitrofenil-cefaloesporina C en bruto.  
Del filtrado se obtienen aún otros 269 g del produc-  
to. El cromatograma de capa delgada en gel de síli-  
ce en el sistema n-butanol-ácido acético glacial-agua  
10. (75:7,5:21) muestra para la 2,4,6-trinitrofenil-ce-  
faloesporina C con relación al ácido picrico como -  
sustancia de referencia un valor  $Rf_p$  de 0,51. Ade-  
más se aprecian aún manchas de compuestos 2,4,6-tri-  
nitrofenilicos polares más fuertes y más débiles. La  
15. transformación del derivado en el ácido 7-aminocefa-  
loesporáico (7-ACA) se puede realizar como sigue:  
a) 200 g de 2,4,6-trinitrofenil-  
cefaloesporina C en bruto se suspenden en 2 litros de  
metilisobutilcetona y se mezcla con una solución de  
20. 200 g de difenildiazometano (obtenida por oxidación  
de benzofenonhidrazona con dióxido de manganeso) en  
600 cc de metilisobutilcetona. Después de 1,5 horas  
se vierte la solución rojo-violeta en 10 litros de -  
éter de petróleo. Se precipita así el éster diben-  
25. zhidrílico de la 2,4,6-trinitrofenil-cefaloesporina  
C en bruto como polvo de color amarillo claro. El -  
precipitado se filtra en vacío, se lava con éter de  
petróleo y se seca en vacío a 40<sup>o</sup>. El producto mues-  
tra en el cromatograma de capa delgada en gel de sí-  
lice en el sistema tolueno-acetona (8:2) un valor  $Rf$   
30. de 0,53. Rendimiento: 280 g del diéster con una pu-



reza del 44% lo que corresponde a un rendimiento del 62% referido a la cefaloesporina C existente en el filtrado de cultivo.

- b) 9,6 g del éster dibenzhidrílico obtenido según el ejemplo a) se disuelven en 260 cc de cloruro metilénico absoluto. Después de enfriar la solución a  $-18^{\circ}$  se mezcla con 5 cc de piridina anhidro y agitando se agrega a continuación, en el plano de 10 minutos, gota a gota, una solución de 7,8 g de pentacloruro de fósforo. Se agita aún durante 45 minutos a  $-12$  hasta  $-10^{\circ}$  y en el plazo de 5 minutos se agregan entonces 64 cc de metanol enfriado a  $-10^{\circ}$ . La solución se agita aún durante 40 minutos a  $-10^{\circ}$  y después durante una hora a  $+10^{\circ}$  mezclándose entonces agitando con 110 cc de ácido clorhídrico 2N. Se separan las fases y la fase acuosa se extrae ulteriormente con 100 cc de cloruro metilénico. Las fases cloruro metilénicas reunidas se evaporan cuidadosamente en vacío. Después de secar en alto vacío se obtiene un residuo marrón, resinoso, de 7-aminocefaloesporato de benzhidrilo.
- c) Se disuelve el 7-aminocefaloesporato de benzhidrilo en 5 cc de anisol, se mezcla enfriando con 15 cc de ácido trifluoracético, se deja reaccionar durante 30 minutos a  $20-30^{\circ}$  y se vierte entonces una mezcla enfriada a  $-10^{\circ}$  de 25 cc de trietilamina y 180 cc de metanol. El pH de una suspensión acuosa al 10% es de 2,3. Se ajusta el pH con trietilamina (6 cc) a 3,5, se enfría a  $-18^{\circ}$  y la mezcla de reacción se deja cristalizar. El precipi-
5. co obtenido según el ejemplo a) se disuelven en 260 cc de cloruro metilénico absoluto. Después de enfriar la solución a  $-18^{\circ}$  se mezcla con 5 cc de piridina anhidro y agitando se agrega a continuación, en el plano de 10 minutos, gota a gota, una solución de 7,8 g de pentacloruro de fósforo. Se agita aún durante 45 minutos a  $-12$  hasta  $-10^{\circ}$  y en el plazo de 5 minutos se agregan entonces 64 cc de metanol enfriado a  $-10^{\circ}$ . La solución se agita aún durante 40 minutos a  $-10^{\circ}$  y después durante una hora a  $+10^{\circ}$  mezclándose entonces agitando con 110 cc de ácido clorhídrico 2N. Se separan las fases y la fase acuosa se extrae ulteriormente con 100 cc de cloruro metilénico. Las fases cloruro metilénicas reunidas se evaporan cuidadosamente en vacío. Después de secar en alto vacío se obtiene un residuo marrón, resinoso, de 7-aminocefaloesporato de benzhidrilo.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



tado cristalino se separa por filtración en vacío, se lava con metanol, cloruro metilénico y dietiléter y se seca en alto vacío. Se obtiene el ácido 7-amino-cefaloesporáico en una pureza del 83,3%. El rendimiento asciende a 1,62 g = 63,5 % referido al éster dibenzhidrílico de la 2,4,6-trinitrofenil-cefaloesporina-C empleado.

Ejemplo 2

10. 10 litros de filtrado de cultivo con un contenido de 1340 mg de cefaloesporina-C por litro y 190 mg de nitrógeno en forma de radicales amino primarios por litro, obtenido por filtración de una solución de fermentación bajo adición de 2% de "Celatom" como auxiliar de filtración, se mezclan con 60 g de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico y, después de ajustar el pH a 8,7 se mantiene durante 2 horas a esta valor pH. Después se mezcla la solución de reacción con 250 g de "Hyflo Supercel" y el valor pH se ajusta agitando con ácido clorhídrico a 4,3.
15. El precipitado amarillo se filtra en vacío junto con el "Hyflo". El filtrado claro se mezcla con 3 litros de éster acético, el pH se ajusta con ácido clorhídrico a 2,0, las fases se separan y la fase éster acética ligeramente emulsionada se clarifica mediante filtración en presencia de 50 g de "Hyflo Supercel". La fase acuosa se extrae ulteriormente aún tres veces cada una con 1 litro de éster acético.
20. Los extractos éster acético reunidos se mezclan con 1 litro de agua y el valor pH se ajusta con sosa cáustica a 6,5. Las fases se sepa-

25. Los extractos éster acético reunidos se mezclan con 1 litro de agua y el valor pH se ajusta con sosa cáustica a 6,5. Las fases se sepa-

30.



- ran. La fase éster acética se extrae <sup>4 DI</sup>ulteriormente aún tres veces con 0,5 litros de agua a un pH de 6,0. Los extractos acuosos reunidos se mezclan con 1 litro de éster acético y el pH se ajusta con ácido clorhídrico a 2,0. Las fases se separan y la fase acuosa se extrae ulteriormente tres veces, cada una con 0,5 litros de éster acético. Los extractos éster acético reunidos se lavan dos veces, cada una con 0,3 litros de solución saturada de cloruro sódico, se seca con sulfato sódico anhidro y se concentra a 0,5 litros. Esta solución concentrada de la 2,4,6-trinitrofenil-cefaloesporina C se mezcla enfriando ligeramente con 1,2 litros de una solución al 47,5 % de difenildiazometano en éter de petróleo. Después de 1 3/4 horas a temperatura ambiente se precipita el éster dibenzhidrilico de la 2,4,6-trinitrofenil-cefaloesporina C mediante introducción de 3,5 litros de éter de petróleo. El precipitado se filtra en vacío y se seca en vacío a 40°. El rendimiento asciende a 51,2 g con un contenido del 40,4%, es decir del 76,2% de la teoría referido a la cefaloesporina C existente en el filtrado de cultivo.

### Ejemplo 3

- 11,76 g de cloruro pícrico se suspenden en 36 cc de n-butanol y se mezcla con una solución de 6,6 g de sulfito sódico anhidro en 72 cc de agua. Después de agitar durante 30 minutos en el pH de la solución 6,5. La mezcla de reacción roja, que contiene 15 g de sal sódica del ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico se vierte a 6 litros de una solución



4 DIC. 1967

- acuosa de cefaloesporina C enriquecida (Contenido -  
calculado en sal sódica de cefaloesporina C 12,3 g;  
contenido en nitrógeno en forma de radicales amino -  
primarios 1,9%). Se ajusta el pH con sosa cáustica
5. a 9,0 y se mantiene entonces durante una hora a 8,5  
hasta 8,7. Después se mezcla la solución de reac-  
ción con 1 litro de una mezcla de n-butilacetato-n-  
butanol (1:1) y se ajusta el pH con ácido clorhídri-  
co a 2,0. Después de 10 minutos se separan las fa-  
ses. La fase acuosa se extrae ulteriormente aún dos  
10. veces, cada una con 500 cc de mezcla de n-butilace-  
tato-n-butanol. Los extractos orgánicos se reúnen,  
el pH se ajusta con sosa cáustica a 5,5 y se extrae  
con 300, después con 200 y finalmente con 100 cc de  
15. agua. Las soluciones acuosas totales se extraen nue-  
vamente a un pH 2 con la mezcla de n-butilacetato-n-  
butanol de arriba (100 cc, después dos veces 50 cc)  
y los extractos orgánicos nuevamente a un pH 5,5 con  
agua (100 cc, después dos veces 50 cc). Los 200 cc  
20. en total de solución acuosa se mezclan con 10 g de -  
"Hyflo Supercel", se enfría a 0 hasta 4º y el pH se  
ajusta con ácido clorhídrico 2N a 1,8 hasta 2,0. Se  
precipita así la 2,4,6-trinitrofenil-cefaloesporina  
C. Esta se filtra en vacío junto con auxiliar de -  
25. filtración, se lava con agua desionizada, fría como  
el hielo, y se seca durante 15 horas a 40º. El ren-  
dimiento asciende a 18,07 g de 2,4,6-trinitrofenil-  
cefaloesporina C sobre 10 g de "Hyflo Supercel". En  
el cromatograma de capa delgada en gel de sílice en  
30. el mismo sistema como en el ejemplo 1 se aprecia ade



más del valor  $Rf_p$  de 0,51 manchas de compuestos trinitrofenílicos más fuertemente polares y menos polares.

- El producto se puede transformar
5. como sigue en el éster dibenzhidrílico: Se suspende la mezcla del precipitado en 180 cc de n-butilacetato y se mezcla con 36 g de difenildiazometano en 180 cc de n-butanol. La suspensión se agita durante 3 horas, se aspira al "Hyflo Supercel" y el filtrado -
  10. claro se vierte en el plazo de 20 minutos en 1800 cc de éter de petróleo (P.eb. 50-70°). El precipitado amarillo claro se aspira en vacío del éster dibenzhidrílico de la 2,4,6-trinitrofenil-cefaloesporina C, se le lava con éter de petróleo y se seca a 40° en -
  15. vacío. El rendimiento asciende a 24,7 g (66%) = 65,3% referido a la cefaloesporina C contenida en la solución de partida.

#### Ejemplo 4

- Se disuelven 17,3 g de cloruro pí
20. crico en 35 cc de n-butilacetato, se agrega una solución de 9,8 g de sulfito sódico anhidro en 60 cc de agua y se agita fuertemente durante 15 minutos. La fase butilacetato se vuelve así incolora y la fase -
  25. acuosa que contiene 22 g de sodio 2,4,6-trinitrobenzenosulfoico intensamente rojo. Se agrega la solución roja a 6 litros de una solución acuosa que contiene una cefaloesporina C en bruto (calculado 12 g, contenido en radicales amino primarios 1,3%), se ajusta el pH con sosa cáustica a 9 y se agita durante 2 horas
  30. a un pH de 8,5 - 8,7. La elaboración se realiza en



forma análoga al ejemplo 3. Se obtienen 21,8 g de -  
2,4,6-trinitrofenil-cefaloesporina C en bruto sobre  
40 g de "Hyflo-Supercel".

5. Mezclando con 43,6 g de difenildia  
zometano análogo al ejemplo 3 se obtienen 28,65 g de  
éster dibenzhidrónico de la 2,4,6-trinitrofenil-cefa  
loesporina C (pureza 55%), es decir 64,6 % de la teó  
ria.

N O T A

10. Descrita suficientemente la natu-  
raleza del invento, así como la manera de realizarlo  
en la práctica, debe hacerse constar que las disposi  
ciones anteriormente indicadas son susceptibles de -  
modificaciones de detalle en cuanto no alteren su -  
principio fundamental. También se hace constar que -  
el invento corresponde a una solicitud de patente -  
presentada en Suiza con fecha 5 de diciembre de 1.966,  
bajo el número 17309/66, acogiéndose por tanto a los  
beneficios que conceden los Convenios Internaciona-  
les en vigor, siendo lo que constituye la esencia del  
referido invento y por lo que se solicita Patente de  
Invención por 20 años en España sobre: "PROCEDIMIENTO  
PARA EL AISLAMIENTO DE LA CEFALOSPORINA C"; ca-  
racterizándose por lo siguiente:
25. 1ª.- Procedimiento para el aisla-  
miento de la cefaloesporina C, en forma de un deriva  
do, caracterizado porque en una solución acuosa diluí  
da, que contiene cefaloesporina C, mediante reacción  
con ácido trinitrobenzosulfoico se forma la N-trini-  
trofenil-cefaloesporina C y se separa de la solución.
- 30.



- 2<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1, caracterizado porque se parte de un líquido de cultivo que contiene cefaloesporina C.
5. 3<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque la reacción se efectúa a temperatura ambiente.
10. 4<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1 - 3, caracterizado porque la reacción se efectúa a un pH de 7 - 10, preferentemente 8,5 hasta 9.
15. 5<sup>a</sup>.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 - 4, caracterizado porque el ácido trinitrobenzenosulfónico se emplea en forma de una solución que se obtiene por reacción de cloruro picrico con un sulfito.
20. 6<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1 - 5, caracterizado porque la N-trinitrofenil-cefaloesporina C se separa por extracción de la solución.
25. 7<sup>a</sup>.- Procedimiento, según la reivindicación 6, caracterizado porque la N-trinitrofenil-cefaloesporina C se extrae a un pH de 1 - 3, preferentemente 2.
30. 8<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 6 ó 7, caracterizado porque la N-trinitrofenil-cefaloesporina C se extrae mediante un disolvente o mezcla de disolventes inmiscible con agua.
- 9<sup>a</sup>.- Procedimiento, según las reivindicaciones 6 ó 7, caracterizado porque la N-trinitrofenil-cefaloesporina C se extrae mediante un disolvente o mezcla de disolventes inmiscible con agua.



trofenil-cefaloesporina C se extrae mediante un intercambiador de iones líquido.

10ª.- Procedimiento para el aislamiento de la cefaloesporina C; tal y como queda -  
5. sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de dieciseis hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 4 DIC. 1967

CIBA SOCIETE ANONYME,

GOMEZ ACEBO Y MODEY

p. p. Firmador: F. Hernández Ruiz