



1970

385447

AGENCIA P. E.
WICLASE C D

385447

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY

RESIDENCIA: 307 East McCarty Street, INDIANAPOLIS

Indiana.- U.S.A.

ENUNCIADO: "UN METODO PARA CONVERTIR CEFALOSPO-
RINA C A UN DERIVADO SOLUBLE EN DISOL-
VENTE ORGANICO".

Prioridad: Patente estadounidense n.º 886.030 del 17-12-69

MJ/S

385447



NOV. 1970

1 Esta invención se refiere a un procedimiento
mediante el cual la cefalosporina C se convierte a un deri-
vado soluble en solvente orgánico acilando el grupo amino
en la cadena lateral de adipoilo con un grupo alfaalógeno
5 o alfa,alfa-dihalógeno alcanóilo de C₂-C₄. Este derivado
soluble en solvente puede después recuperarse fácil y efi-
cientemente del caldo de fermentación acuoso mediante ex-
tracción con un solvente orgánico.

10 El grupo halogenoalcanóilo inferior de solu-
bilización empleado es uno derivado de un ácido carboxíli-
co de C₂-C₄ que tiene uno o dos átomos de halógeno en el
átomo de carbono alfa. El átomo de halógeno preferido es
cloro pero pueden utilizarse otros halógenos tales como bro-
mo y fluor. Incluyen ejemplos de grupos de solubilización
15 adecuados, cloroacetilo, dicloroacetilo, bromoacetilo,
fluoroacetilo, alfa-cloropropionilo, alfa,alfa-dicloropro-
pionilo, alfa-clorobutirilo y alfa-cloro-alfa-metil-propio-
nilo. Se prefiere el grupo cloroacetilo.

20 Se utilizan procedimientos de acilación usua-
les conocidos a aquellos expertos en el arte para colocar
el grupo de solubilización en el grupo amino de la cadena
lateral de la cefalosporina C. La acilación puede condu-
cirse utilizando un anhídrido o halogenuro de halogenoal-
canóilo del ácido halogenado. Se han logrado resultados
25 particularmente buenos utilizando un cloruro de halogeno-
alcanóilo tal como cloruro de cloroacetilo. Sorprendente-
mente, el empleo de un anhídrido mixto de ácido cloroacé-
tico tal como anhídrido acéticocloroacético da casi exclu-
sivamente la cefalosporina C N-cloroacetilada.

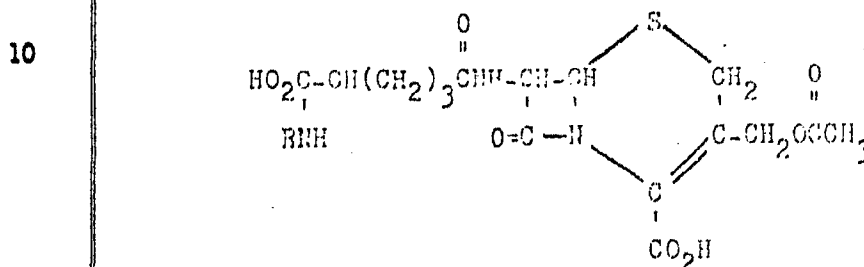
30 La presente invención provee un método para

385447



1 convertir la cefalosporina C a un derivado soluble en sol-
 vente orgánico que comprende acilar el grupo amino en la
 cadena lateral de adipóilo de la cefalosporina C con un
 grupo alfa-halógeno o alfa,alfa-dihalógenoalcanoilo de C₂-
 5 C₄.

La presente invención también provee una ce-
 falosporina C soluble en solvente orgánico que tiene la
 fórmula



15 en donde R es alfa-halógeno o alfa,alfa-dihalógenoalcanoí-
 lo de C₂-C₄.

El propósito primario para convertir la cefa-
 losporina C a un derivado soluble en solvente orgánico es
 20 ayudar al aislamiento de la cefalosporina C del caldo de
 fermentación. Para lograr este efecto es necesario que la
 reacción de acilación se conduzca en el caldo de fermenta-
 ción. Esto puede lograrse fácilmente. El caldo se filtra
 preferiblemente antes de la etapa de acilación y puede tam-
 25 bien concentrarse para evitar el manejo de grandes volú-
 menes de agua.

Esta N-halogenoalcanoilcefalosporina C puede
 ahora extraerse del caldo de fermentación con un solvente
 orgánico inmisible con el agua. Por inmisible en agua
 se quiere dar a entender un solvente que tiene solubilidad
 30 limitada en agua y no necesariamente uno completamente in-

385447



1 soluble. Por ejemplo, el acetato de etilo que es ligeramen-
te soluble en agua es un solvente excelente para esta ex-
tracción. La extracción se conduce preferiblemente a un pH
ácido.

5 Los solventes orgánicos que pueden utilizarse
en la etapa de extracción incluyen ésteres inferiores ta-
les como acetato de etilo, acetato de n-propilo, acetato
de isopropilo, y acetato de sec-butilo. Es a veces ventajo-
so mezclar el éster con la décima parte de un volumen de
10 alcohol inferior tal como alcohol etílico o alcohol n-bu-
tílico. Incluyen otros solventes adecuados nitrilos tales
como butironitrilo y adiponitrilo y cetonas tales como ci-
clohexanona y metilisobutilcetona. Los solventes preferi-
dos son acetato de etilo, butironitrilo y ciclohexanona.

15 La N-halogenoalcanoilcefalosporina C puede
separarse del solvente orgánico mediante cualquier procedi-
miento bien conocido. Por ejemplo, la solución puede hacer-
se básica para preparar una sal del derivado de cefalospo-
rina C que precipita del solvente orgánico por agitación,
20 preferiblemente por enfriamiento de la solución. Este deri-
vado aislado puede después someterse a una reacción de di-
sociación de cadena lateral para obtener el ácido 7-amino-
cefalosporánico. Puede también ser posible conducir la reac-
ción de disociación en el solvente orgánico utilizado para
25 la extracción, de manera que no es necesario el aislamien-
to de la N-halogenoalcanoilcefalosporina C.

30 Los siguientes ejemplos ilustrarán la prepa-
ración de los derivados de cefalosporina C solubles y su
extracción del caldo de fermentación acuoso. Se utilizaron
en este trabajo dos métodos de análisis de actividad de

385447



1970

1 cefalosporina C. El primero es un método ultravioleta que
detecta no únicamente la cefalosporina C sino otros mate-
riales relacionados, los cuales reaccionarán con el reac-
tivo de acilación. El segundo método es un método de nicoti-
5 namida el cual es más específico para la cefalosporina C,
y los resultados de este método se utilizan para calcular
los rendimientos.

EJEMPLO 1

10 Un litro de caldo de fermentación de cefalos-
porina C que se había filtrado y tratado con resina de in-
tercambio de iones, se encontró, mediante análisis ultra-
violeta que contenía 89 g. de material similar a cefalos-
porina C y mediante el análisis de nicotinamida se encon-
tró que contenía 75,25 g. de cefalosporina C. A este litro
15 de caldo de fermentación se agregó un litro de solución sa-
turada de bicarbonato de sodio que contiene 25 ml. de so-
lución de hidróxido de sodio al 25% y 500 ml. de acetona.
Durante un periodo de quince minutos, se agregaron 500 ml.
de una solución de 72 ml. de cloruro de cloroacetilo en
20 acetona. Durante este periodo de adición el pH se mantuvo
entre 8,0 y 8,7 y la reacción se mantuvo en un baño helado
para mantener la temperatura dentro de la escala de 20º
a 28º C. La mezcla de reacción se agitó 15 minutos adiciona-
les después de que se terminó la adición. El volumen total
25 de la mezcla de reacción fue de 3070 ml.

A 1520 ml. de esta mezcla de reacción origi-
nal se agregaron 300 ml. de benceno y el pH de la mezcla
se ajustó a 3,5 mediante la adición de 135 ml. de ácido
clorhídrico 6 normal. Las fases se dejaron separar, y el
30 benceno se desechó dejando 1220 ml. de solución acuosa. Es-

385447



1970

1 tos 1220 ml. se dividieron en dos porciones iguales que se referirán como la solución A1 y A2.

5 A la solución A1 se agregó un volumen igual de acetato de etilo y el pH se ajustó a 2,0 mediante la
adición de ácido clorhídrico 6 normal. Las fases se separaron y se llevó a cabo una segunda extracción de igual
10 volumen con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se secaron sobre sulfato de sodio dejando a 1200 ml. de solución de acetato de etilo que mediante análisis ultravioleta contuvo 11,5 g. de actividad. A la
solución de acetato de etilo se agregaron 16,6 ml. de quinolina y la mezcla se sembró. La mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche y después se enfrió antes de
15 la filtración. El producto sólido se lavó con 25 ml. de acetona y se secó en una estufa al vacío para producir 18,9 g. de sal quinolina de N-cloroacetilcefalosporina C.

20 A la solución A2 se agregaron 200 ml. de acetona y 810 ml. de acetato de etilo. El pH se ajustó a 2,0 con ácido clorhídrico 6 normal y las fases se dejaron separar. La solución de acetato de etilo se secó sobre sulfato de sodio para producir 1080 ml. de extracto de acetato de etilo que contuvo según se mostró por análisis ultravioleta 12,9 g. de actividad. A esta solución se agregaron
25 18,6 ml. de quinolina y la mezcla se sembró. La mezcla se agitó toda la noche y se enfrió antes de filtrar los sólidos. El producto sólido se lavó con acetona y se secó en una estufa al vacío para producir 17,8 g. de sal quinolina de N-cloroacetilcefalosporina C.

30 Otros 1520 ml. de la mezcla de reacción original se trataron con un volumen igual de acetato de etilo.



1 y el pH se ajustó a 2,0 mediante la adición de 235 ml. de
ácido clorhídrico 6 normal, y las fases se separaron. Se
llevó a cabo una segunda extracción con un volumen igual
de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo
5 combinados tuvieron un volumen de 3000 ml., y el análisis
ultravioleta mostró que contenían 80,9 g. de actividad.

EJEMPLO 2

10 A 1 litro de caldo de fermentación de cefa-
losporina C tratada con resina que contiene 32,5 g. de
actividad mediante análisis ultravioleta y 26,15 g. median-
te análisis de nicotinamida, se agregaron 300 ml. de aceto-
na y 100 g. de bicarbonato de sodio seco, mientras la mez-
cla se mantuvo en un baño de hielo a 10°C. El pH se ajus-
15 tó a 8,5 mediante la adición de solución al 25% de hidró-
xido de sodio. Mientras se continuó el enfriamiento, se
agregó una solución de 45 ml. de cloruro dicloroacetilo en
225 ml. de acetona, a la mezcla de reacción durante un pe-
riodo de 15 minutos. Durante la adición, el pH se mantuvo
de 8,0 a 8,8 mediante la adición de solución al 25% de hi-
20 dróxido de sodio. Al término de la adición, la mezcla se
separó del baño de hielo y se agitó a 20°C durante 20*
minutos. El pH se ajustó después a 3,5 con ácido clorhídri-
co 6 normal y se agregaron 1700 ml. de acetato de etilo
para extracción mientras el pH se ajustó adicionalmente
25 con ácido clorhídrico 6 normal a 1,9. Esta mezcla se agi-
tó durante 15 minutos y se centrifugó para separación. La
fase de acetato de etilo tuvo un volumen de 1940 ml. y el
análisis ultravioleta mostró 12,8 g. de actividad. Al ex-
tracto de acetato de etilo se agregaron 41 ml. de quinoli-
30 na en dos porciones aproximadamente iguales y la mezcla

385447



NOV. 1970

1 se sembró. Después de reposar en el refrigerador durante
15 semanas, la mezcla se filtró. Los sólidos se lavaron
con acetona y se secaron a 35°C, en una estufa de vacío
para producir 20,6 g. de sal de quinolina de N-dicloro-
5 acetilcefalosporina C.

EJEMPLO 3

Se repitió el procedimiento del ejemplo 2
sustituyendo el cloruro de dicloroacetilo con cloruro de
2-cloropropionilo. La temperatura se elevó a 40°C duran-
10 te la adición, y el pH fue difícil de controlar, variando
entre 7,5 y 9,3. El producto de la reacción fue la sal de
quinolina de la N-(2-cloropropionil)cefalosporina C.

EJEMPLO 4

15 Siguiendo el procedimiento del ejemplo 2,
utilizando 4400 ml. de caldo de fermentación, que contie-
nen 145 g. de actividad mediante análisis ultravioleta y
133 ml. de cloruro de cloroacetilo, se obtuvieron 11800 ml.
de extracto de acetato de etilo que contiene 123,4 g. de
N-cloroacetilcefalosporina C.

EJEMPLO 5

20 Cuatro litros de caldo de fermentación filtra-
dos que tiene un pH de 4,4 que contienen 5,77 mg. de cefa-
losporina C por ml. mediante análisis de nicotinamida se
enfrió en un baño de hielo. A este caldo frío se agrega-
25 ron 20 g. de decahidrato de borato de sodio y 1200 ml. de
acetona. El pH de esta mezcla se ajustó a 8,5 mediante la
adición de solución al 25% de hidruro de sodio. A la mez-
cla enfriada se agregó lentamente una solución de 74 ml.
de cloruro de cloroacetilo en 600 ml. de acetona mientras
30 que el pH se mantuvo a 8,5. Después de que la adición fue

385447



NOV. 1970

1 completa la mezcla se agitó durante otros 30 minutos man-
teniendo el pH a 8,5. El pH se descendió a 4,5 mediante
la adición de ácido sulfúrico al 25%, se agregaron 6800
ml. de acetato de etilo, y el pH se disminuyó a 2,0 me-
5 diante la adición de más ácido sulfúrico. Después de agi-
tar durante 15 minutos se formó una emulsión y las fases
no se separaron. A la emulsión se agregaron 200 ml. de
acetona y 150 ml. de un desemulsificante comercial. Las
fases se separaron y se hizo una segunda extracción con ace-
10 tato de etilo de la fase acuosa, utilizando 1 litro de ace-
tato de etilo. Las fases de acetato de etilo combinadas
tuvieron un volumen total de 9,6 litros. Este se concentró
a 4,5 litros y se dividió en dos vasos. A cada vaso se
agregaron 70 ml. de quinolina y la mezcla se agitó toda
15 la noche. Se formaron cristales en un vaso mientras que se
separó aceite en el otro. El líquido sobrenadante se de-
cantó del aceite y se sembró. La solución se concentró
después hasta que empezaron a formarse sólidos. La mezcla
se combinó con la mitad de aquella que tuvo previamente
20 la formación de cristal. La mezcla se agitó y se enfrió
durante 1 hora, filtrándose después. La sal de quinolina
sólida de la N-cloroacetilcefalosporina C se lavó con una
pequeña cantidad de acetona y se secó en una estufa de
vacío a 40°C, para producir 15,3 gramos.

25

EJEMPLO 6

30

10 litros de caldo de fermentación filtrados
se ajustaron a un pH de 6,2 y se concentraron en un evapo-
rador instantáneo a 1,8 litros. El análisis ultravioleta
mostró que este caldo concentrado contenía 46,5 gramos de
actividad de cefalosporina C por litro. El caldo filtrado

-10 -
385447



1 concentrado se enfrió en un baño helado y se agregaron 18
gramos de decahidrato de borato de sodio y 540 mililitros
de acetona. El pH se ajustó a 8,5 con solución al 25 por
5 ciento de hidróxido de sodio. Se agregó lentamente una
solución de 56,5 mililitros de cloruro de cloroacetilo
en 4085 mililitros de acetona, mientras el pH se mantuvo
de 8,5 a 9,0 mediante la adición de solución al 25 por
ciento de hidróxido de sodio. La mezcla se agitó 15 minu-
tos después de que la adición fue completa. A la mezcla se
10 agregaron 1530 mililitros de acetato de etilo, el pH se
ajustó a 2,0 con ácido sulfúrico al 25 por ciento. La
mezcla se agitó 15 minutos y las fases se separaron median-
te centrifugación. Se hizo una segunda extracción con 1500
mililitros de acetato de etilo, y los dos extractos de ace-
15 tato de etilo se combinaron para un volumen total de 3825.
mililitros. Los extractos combinados se concentraron a
750 mililitros y se agregó un litro de acetato de etilo
saturado con agua. Se agregó quinolina (100 mililitros),
la mezcla se enfrió en el refrigerador, se filtró, y el
20 sólido se lavó con 200 mililitros de acetona y se secó a
40°C. en una estufa de vacío toda la noche para producir
51,8 gramos de la sal quinolina de la N-cloroacetilcefa-
losporina C.

EJEMPLO 7

25 El pH de una solución de 4,6 gramos de la
sal de sodio de cefalosporina C que tiene una pureza de
89 por ciento en 30 mililitros de agua, se ajustó a 9,0
mediante la adición de solución de hidróxido de sodio al
20 por ciento. Se agregó gota a gota una solución de 1,3
30 mililitros de cloruro de cloroacetilo en 8,7 mililitros

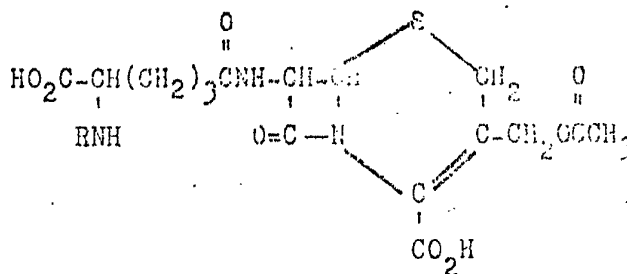
385447



1970

1 de acetona, mientras el pH se mantuvo de 8,0 a 9,3 median-
 te la adición de hidróxido de sodio al 10 por ciento. La
 adición requirió aproximadamente 15 minutos, y la mezcla
 se agitó durante 5 minutos adicionales. El pH se ajustó
 5 después a 6,5 con ácido clorhídrico 6N, se agregaron 80
 mililitros de acetato de etilo, y el pH se descendió a 2,0
 con ácido clorhídrico 6N. Después de agitar durante 3 mi-
 nutos, las fases se separaron y la fase de acetato de eti-
 lo se secó sobre sulfato de sodio. Se agregó una solución
 10 metanólica saturada de acetato de sodio a un pH de 7,2
 que se elevó a 7,7 por agitación. El sólido blanco que se
 separó, se filtró, se enfrió y se secó en un desecador to-
 da la noche para producir 2,5 gramos de la sal de sodio
 de N'-cloroacetilcefalosporina C.

15 Los derivados solubles en solvente orgánico de
 la cefalosporina C tienen la fórmula:



20 en donde R es un grupo alfa-halógeno o alfa,alfa-dihaló-
 genoalcanoilo de C₂-C₄. El halógeno preferido es cloro y
 25 el grupo halogenoalcanoilo preferido es cloroacetilo.

Además, para obtener los ácidos libres como
 se exhibieron en la fórmula anterior, estos derivados se
 han obtenido también en la forma de sales. Estas sales
 pueden ser las sales de metal alcalino, de metal alcalino
 30 térreo o de amina de los ácidos carboxílicos. Las aminas

385447



1 típicas que se han utilizado para la formación de sal son
quinolina, ciclohexilamina, 5-etil-2-metilpiridina, 2-pi-
colina, 3-picolina, 4-picolina, N-etilmorfolina, N-metil-
5 morfolina, 2,6-lutidina, N,N-dietilciclohexilamina, hexa-
metilentetraamina, N,N-dimetilbencilamina, o N,N'-diben-
ciletildiamina.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita, deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

10 1.- Un método para convertir cefalosporina C a un derivado soluble en disolvente orgánico caracterizado porque comprende acilar el grupo amino en la cadena lateral de adipóilo de la cefalosporina C con un grupo alfa-halógeno o alfa,alfa-dihalogenoalcanoilo de C₂-C₄.

15 2. Un método según la Reivindicación 1, en donde el halógeno es cloro.

3. Un método según las Reivindicaciones 1 ó 2, en donde el grupo alcanoilo es cloroacetilo.

20 4. Un método según las Reivindicaciones 1, 2 ó 3, en donde la acilación se lleva a cabo en el caldo de fermentación acuoso.

25 5. Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN METODO PARA CONVERTIR CEFALOSPORINA C A UN DERIVADO SOLUBLE EN DISOLVENTE ORGANICO".



385447

1

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva que consta de trece páginas mecanografiadas.

5

Madrid, 11 Noviembre 1970

BERNARDO UNGRIA

p.p.

10

15

20

25

30