

Ref. 109



419358

Int. Cl.²: C07D

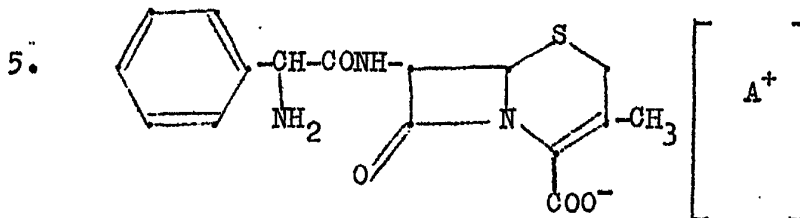
P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE SALES DE CEFAL-
LEXINA CON AMINOACIDOS", a favor de la firma española ANTO-
NIO GALLARDO, S.A., residente en BARCELONA, Cardener, 72-74.

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente patente de invención se refiere a un
nuevo procedimiento para la preparación de sales de cefale-
xina con aminoácidos de fórmula

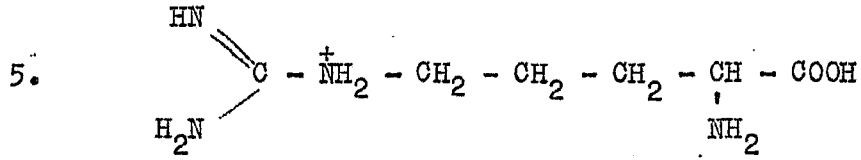
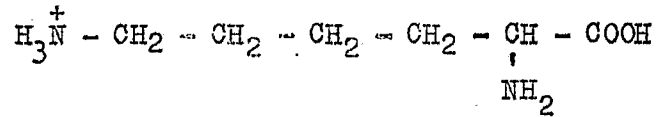


10.

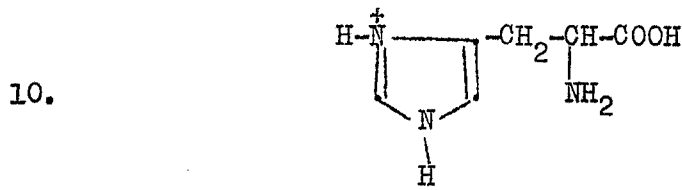
419358



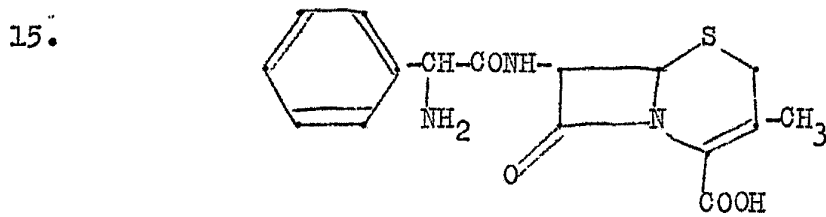
siendo A. :



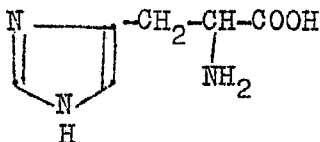
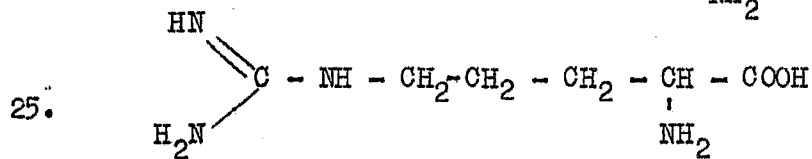
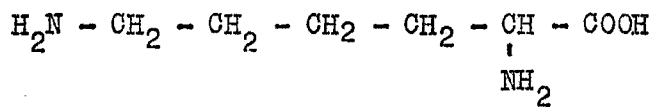
6



Se parte en el procedimiento, de cefalexina de fórmula :



20. que reacciona con aminoácidos de naturaleza básica tales como lisina, histidina y arginina :

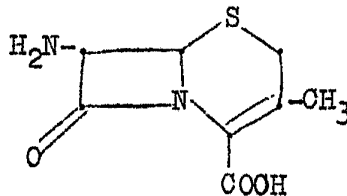




419358

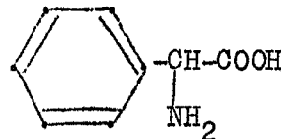
El procedimiento está basado en que el ácido 7-amino-desacetoxi-cefalosporánico (7-ADCA) de fórmula:

5.



se acila con derivados del ácido D-alfa-amino-fenilacético

10.



a través de un proceso enzimático. De esta forma se obtiene la cefalexina en forma cruda, la cual se usa directamente para la salificación con los aminoácidos citados.

15.

La acilación del ácido 7-ADCA se efectúa en presencia de un microorganismo *Flavobacterium* ATCC 21429 (American Type Culture Collection nº 21429) o de sus preparaciones enzimáticas que son específicas para la acilación del grupo amino del ácido 7-ADCA permitiendo la introducción del grupo D-alfa-amino-fenil-acetilo.

20.

El microorganismo productor de la enzima de acilación se prepara por cultivo aeróbico en medio nutritivo constituido por una fuente de nitrógeno orgánico o mineral como la peptona, extracto de levadura, de licor de maíz, extracto de carne, hidrolizados de proteína de soja y sales de amonio, una fuente de carbono como glucosa, melazas e hidrolizado de almidón. La temperatura oscila entre 20 y 35°C durante 10-50 horas.

25.

419358



La enzima de acilación se usa como endo-enzima o también se utilizan las preparaciones enzimáticas, el cultivo microbiano, las células bacterianas vivas recogidas después del cultivo, o una suspensión de las mismas.

5. Se utiliza el ácido 7-ADCA en concentraciones comprendidas entre 0,1 y 25 mg/ml con concentración ideal comprendida entre 2 y 6 mg/ml. El ácido D-alfa-amino-fenil-acético no se usa en forma libre sino como amida o como éster etílico o metílico, ya que el ácido libre no reacciona, siendo conveniente la utilización del derivado del ácido D-alfa-amino-fenil-acético en un exceso de 2 a 25 moles respecto al ácido 7-ADCA con un exceso molar ideal comprendido entre 4 y 12. La temperatura de reacción es la comprendida entre 30 y 37° C. El pH de la mezcla de reacción que se usa está aproximadamente entre 5,5 y 7,5.
- 10.
- 15.

- Una vez terminada la reacción enzimática, la cefalexina formada queda disuelta junto con los subproductos de la reacción, y esta disolución se pasa a través de una resina de intercambio iónico. De esta forma se obtiene una disolución purificada de cefalexina de la cual se aísla el producto sólido ajustando el pH entre 4 y 6. El producto obtenido es de pureza suficiente para ser salificado y por tanto se suspende en agua, se añade el aminoácido deseado, y la disolución obtenida se liofiliza con lo que se tiene la sal de cefalexina con lisina, arginina e histidina.
- 20.
- 25.

A continuación se citan algunos ejemplos ilustrativos.

EJEMPLO 1

100 ml. de un medio de cultivo (pH: 7,0) conteniendo



- do 1% de extracto de carne, 1% de polipeptona y 0,5 % de cloruro sódico se inocula con Flavobacterium ATCC-21429 y se agita a 27° durante 50 horas. Después se ajusta el pH a 7,5 con disolución de hidróxido sódico 1N y se añade a la disolución 100 ml. de tampon fosfato decimomolar (pH: 7,5) conteniendo 4 mg/ml. de ácido 7-ADCA y 30 mg/ml. de clorhidrato del ester metílico del ácido D-alfa-amino-fenilacético. Se pone a 37° durante 4 horas, se centrifuga y la capa acuosa se pasa a través de una resina intercambiadora de iones Dowex 1x2 (0,149 mm - 0,074 mm). De la disolución obtenida se aísla la cefalexina por neutralización y concentración obteniéndose 0,380 g. Este producto del 92% de pureza se suspende en 13 ml. de agua y mientras se agita se añade una disolución de 0,140 g. de lisina en 2 ml. de agua se calienta a 40°C. durante 10 minutos, se filtra y la disolución se liofiliza obteniéndose 0,480 g de la sal cefalexina-lisina. Punto de fusión: 170-174° C (d).

EJEMPLO 2

20. Siguiendo un procedimiento análogo al descrito en el ejemplo 1 se obtiene la sal de cefalexina-arginina. Punto de fusión: 198-202° C. (d).

EJEMPLO 3

25. Un medio de cultivo conteniendo 5% de extracto de aceite de soja, 0,08% de extracto de carna, 0,1 % extracto de levadura, 0,5% de extracto de maceración de maiz, 2% de glucosa, 0,35 % de cloruro potásico, 0,45 % de sulfato amónico y 0,02 % de fosfato dipotásico, se inocula con Flavobacterium ATCC-21429 y se pone a 27° con agitación durante 43 horas. Se centrifuga 950 ml. de caldo de cultivo y la ma-

419358



- sa de células obtenidas y una vez secas, pesan 3,2 g. Estas se suspenden en un litro de agua destilada y esta suspensión se vierte sobre un litro de una disolución acuosa conteniendo 8 g. de ácido 7-ADCA y 30 g. de clorhidrato de éster metílico del ácido D-alfa-amino-fenil-acético. Se ajusta el pH a 7,5 y se efectúa la reacción enzimática a 37°C. durante 2 horas. Después se centrifuga y la fase acuosa se pasa a través de una resina de cambio iónico Dowex 1x2 (0,149 mm-0,074 mm). De la disolución obtenida se aislan 8 g de cefalexina de una pureza del 88%. Este producto se suspende en 280 ml. de agua y mientras se agita, se añade una disolución de 2,8 g. de lisina en 50 ml. de agua. Se mantiene la agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos y después se calienta a 40° durante 10 minutos. Se filtra y se liofiliza obteniéndose 9,7 g de punto de fusión 171-173° C (d).

EJEMPLO 4

Siguiendo el ejemplo 3 se ha logrado preparar la sal cefalexina-arginina.

20.

EJEMPLO 5

- Se inocula con Flavobacterium ATCC-21429 un medio de cultivo como el que se describe en el ejemplo 3 efectuando el cultivo a 37° C. durante 26 horas. Se toman 150 ml. de líquido cultivado y se vierten sobre 15 litros del mismo medio de cultivo citado. Se mantiene la temperatura a 27°C. durante 24 horas agitando y pasando una corriente de aire a razón de 30 litros por minuto.

25.

Se centrifuga para recoger las células bacterianas y se suspenden en 1,5 litros de agua, se vuelve a cen-

- 7 -
419358



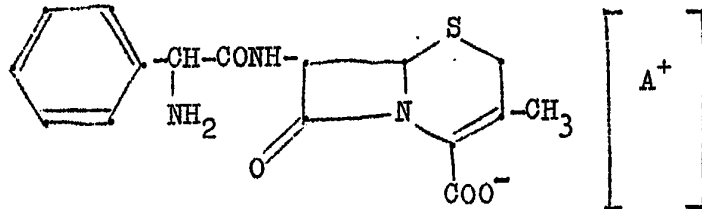
- trifugar, se suspende de nuevo en 750 ml. de agua y se liofiliza obteniéndose 32 g de células secas, 3 g. de estas células se ponen en un litro de una disolución acuosa que contiene 5 g. de ácido 7-ADCA y 8 g. de clorhidrato del éster metílico del ácido D-alfa-amino-fenil-acético siendo el pH de la disolución 6,2. Se agita durante 30 minutos, se añaden otros 6 g. de clorhidrato del éster metílico del ácido D-alfa-amino-fenil-acético y después se añade un total de otros 10 g, en porciones y en el intervalo de media hora. Después de 4 horas se puede dar por finalizada la reacción enzimática y se continua la preparación de la sal cefalexina-lisina como se indica en el ejemplo 3.
- 5.
- 10.

REIVINDICACIONES

- Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones :
- 15.

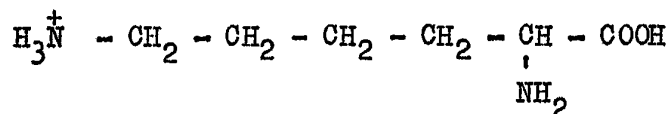
1.- Un procedimiento de preparación de sales de cefalexina con aminoácidos esencialmente con lisina, arginina o histidina de fórmula

20.



25.

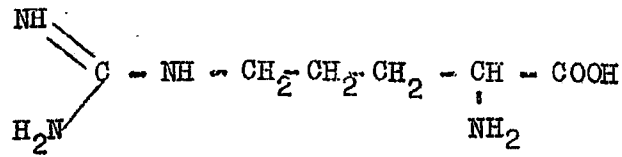
siendo A⁺ :



Ag

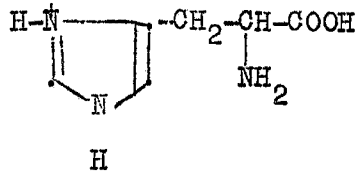


41935R

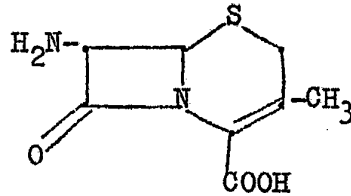


6

5.



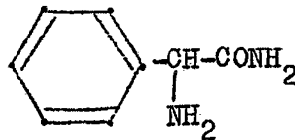
10. caracterizado porque se hace reaccionar el ácido 7-amino-desacetoxi-cefalosporánico de fórmula :



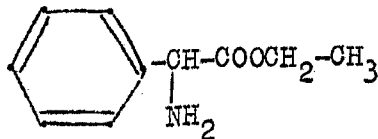
15.

con la amida, ésteres etílico o metílico del ácido D-alfa-amino-fenil-acético, de fórmula

20.



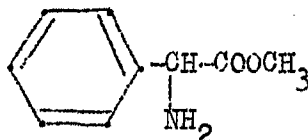
25.



Ag



419358



5. en presencia del microorganismo *Flavobacterium* ATCC-21429 (American Type Culture Collection nº 21429) dando lugar a la obtención de cefaloxina cruda que se salifica con el aminoácido deseado.
- 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1
10. caracterizado porque el microorganismo citado se utiliza en forma de caldo de cultivo.
- 3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el microorganismo se utiliza como células bacterianas.
15. 4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza el microorganismo citado en forma de preparación enzimática.
- 5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la amida y los ésteres del ácido D-al-
20. fa-amino-fenil-acético se usan como sales de adición, es decir, como clorhidrato, sulfato, fosfato, nitrato.
- 6.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4 y 5 caracterizado porque la reacción enzimática se efectúa a una temperatura comprendida entre 20 y 40°, un
25. pH comprendido entre 5,5 y 7,5.
- 7.- Un procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque después de la reacción enzimática se efectúa una purificación a través de una resina de intercambio iónico y una salificación en medio acuoso con poste-

Rg



rior eliminación del agua por liofilización.

8.- Un procedimiento para la preparación de sales de cefalexina con aminoácidos.

5. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 10 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 5 OCT. 1973

p.a.

M.^a LUISA ISERN CUYAS
p. p.


Firmado: JOSE F. NIETO

MLA.

Pg