

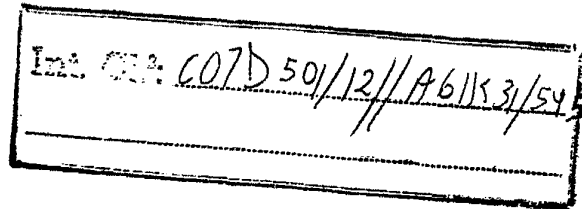
433995

P.- 59.508

BLACKBURN

CASE 1- SPAIN

MEMORIA DESCRIPTIVA



para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de SMITHKLINE CORPORATION

entidad norteamericana

establecida en 1500 Spring Garden Street, Filadelfia,  
Pensilvania 19101, Estados Unidos de  
América,

por: "PROCEDIMIENTO PARA PURIFICAR UNA CEFALOSPORINA"

(Clase Internacional C07D)

22.2.75

- 1 -

La presente invención se refiere a un procedimiento para purificar cefalosporinas, en particular a un procedimiento para eliminar las impurezas por uso de resinas no iónicas, a un pH controlado.

5

#### FUNDAMENTOS

Los cefalosporinas son un grupo importante de antibióticos de amplio espectro, que se usan ampliamente en el tratamiento de infecciones bacterianas. Los compuestos que han tenido éxito comercial se clasifican como semisintéticos, porque se obtienen por modificación química de un núcleo central que se obtiene de fuentes naturales. Como en la mayoría de las modificaciones químicas, los productos se obtienen junto con otros materiales denominados impurezas, que se han de eliminar. Los procedimientos usados anteriormente para purificar los productos crudos han sido ineficaces en la producción de material farmacéuticamente aceptable. Entre esos procedimientos se incluyen extracciones con disolvente, uso de resinas intercambiadoras de iones, cromatografía sobre adsorbentes usuales, métodos de precipitación con sales, o uso de carbón orgánico activado.

10

15

20

25

Se ha hallado ahora que adsorbentes polímeros macrorreticulares sintéticos son útiles para eliminar rápida y eficazmente las impurezas, y dan gran

des rendimientos de recuperación de productos de cefalosporina y sus derivados intermedios, todos los cuales tienen un grupo ácido carboxílico libre.

5 Las resinas y los procedimientos relacionados con su uso se exponen en las patentes de los EE.UU. nº 3.531.463, 3.663.467 y 3.725.400. Los procedimientos expuestos se refieren al aislamiento de compuestos orgánicos solubles en agua a partir de una solución acuosa diluída, o a la eliminación de impurezas orgánicas de un efluente acuoso. Se ha expuesto la descoloreación de azúcar crudo.

10

Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para acrecentar la pureza de cefalosporinas y sus derivados, con pérdidas mínimas de material.

15

Otro objeto de esta invención es proporcionar un procedimiento que implique el uso de adsorbentes polímeros no iónicos, para purificar cefalosporinas y sus derivados.

20 Otro objeto de esta invención es efectuar el procedimiento de purificación a un pH controlado para que la eficacia sea máxima.

Otros objetos de la invención serán evidentes de la memoria descriptiva completa.

25

### DESCRIPCION DE LA INVENCION

En general, los compuestos de cefalosporina farmacéuticamente importantes difieren entre sí en los grupos que están en las posiciones 7 y 3 del núcleo cefem. Estos se preparan por acilación de una 7-aminocefalosporina, que puede ser previa o subsiguientemente modificada en la posición 3, tal como por desplazamiento de un grupo acetoxilo por un grupo nucleófilo. Para los fines de esta exposición, la descripción siguiente de la invención se esquematizará como aplicada a la cefazolina, que es un nombre genérico del ácido 7-(1-tetrazolilacetamido)-3-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico. Esto no debe ser interpretado como limitación de la invención. El procedimiento aquí descrito es aplicable a cualquier compuesto de cefalosporina que tenga un grupo ácido carboxílico libre, preferiblemente en la posición 4 del núcleo cefem. Entre otras cefalosporinas que se pueden purificar por este procedimiento se incluyen las que tienen diversos grupos acilo, tales como tienilacetilo, mandeloílo, fenilglicilo, p-hidroxifenilglicilo, cianoacetilo, piridiltioacetilo,  $\alpha$ -amino-1,4-ciclohexadienilacetilo, y similares, en posición 7. El sustituyente en posición 3 puede ser metilo, acetoximetilo o heterocíclicotiometil, donde el grupo heterocí-

clico es tetrazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, oxa-  
diazolilo y similares. Entre otras cefalosporinas den-  
tro del ámbito de la invención se incluyen ácido 7-  
tienilacetamidocefalosporánico (cefalotina), metil-3-  
5 cefem-4-carboxilato de 7-tienilacetamido-3-piridinio  
(cefaloradina), ácido 7-( $\alpha$ -aminofenilacetamido)cefa-  
losporánico (cefaloglicina), ácido 7-( $\alpha$ -aminofenilace-  
tamido)desacetoxicefalosporánico (cefalexina), ácido  
7-( $\alpha$ -amino-1,4-ciclohexadienilacetamido)desacetoxicefa-  
10 losporánico (cefradina), ácido 7-cianoacetamidocefalo-  
sporánico, ácido 7-(4-piridiltioacetamido)cefalosporáni-  
co, ácido 7-(4-piridiltioacetamido)cefalosporánico, áci-  
do 7-mandelamido-3-(1-metiltetrazol-5-iltiometil)-3-ce-  
fem-4-carboxílico y ácido 7-(3-sidnonacetamido)-3-(5-  
15 metil-1,3,4-tiadiazol-2-iltiometil)-3-cefem-4-carbo-  
xílico. La invención también es útil para purificar  
compuestos intermedios tales como 7-ACA, 7-ADCA, áci-  
do 7-amino-3-(1-metiltetrazol-5-iltiometil)-3-cefem-4-  
carboxílico, ácido 7-amino-3-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-  
20 2-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico, y similares.

En la secuencia usual para preparar ce-  
fazolina, la reacción final es una acilación de ácido  
7-amino-3-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-iltiometil)-3-ce-  
fem-4-carboxílico con ácido 1-tetrazolilacético. Usual-  
25 mente se emplea el método de activación por anhídrido

5 mixto. El producto crudo obtenido contiene una varie  
dad de impurezas entre las que se incluyen materiales  
de partida sin reaccionar, el ácido carboxílico del  
anhídrido mixto, y materiales coloreados, que se deno  
minarán en lo sucesivo alquitranes, cuya estructura  
es desconocida.

10 Se ha hallado que las impurezas se pue  
den eliminar por un procedimiento de adsorción selec-  
tiva sobre una resina no iónica polímera. Por control  
de pH, las impurezas se adsorben sobre la resina más  
fuertemente que una sal de cefalosporina, tal como la  
sal sódica o de trietilamonio, que solo se adsorbe dé  
bilmente, y por tanto se eluye en primer término.

15 Las resinas no iónicas polímeras que  
son útiles en el procedimiento son copolímeros reticu-  
lados de estireno-divinilbenceno, o polímeros reticu-  
lados de un éster acrílico. Las resinas tienen un diá  
metro medio de poros de 50-250 Å y una superficie es-  
pecífica de 100-750 m<sup>2</sup>/g. Las resinas se usan en el ta  
20 maño de partículas comercialmente disponible de 841-  
297 micras; sin embargo, 177-149 micras dan una efica-  
cia mejorada. Las resinas que son útiles en este proce-  
dimiento están disponibles en el comercio bajo las mar  
cas registradas "Amberlite XAD-2", "Amberlite XAD-7"  
25 y "Amberlite XAD-8" (Rohm and Haas Company, Filadelfia,

Pennsylvania). Las resinas preferidas son las "XAD-2" y "XAD-8", siendo particularmente preferida la "XAD-8". La "XAD-2 es un copolímero reticulado de estireno-divinilbenceno con un diámetro medio de poros de 90 Å. Las "XAD-7" y "XAD-8" son polímeros reticulados de un éster acrílico, con un diámetro medio de poros de 80 y 250 Å, respectivamente.

Si una cefalosporina tal como cefazolina ha sido aislada de la reacción como un sólido crudo, se prepara una solución disolviendo la cefazolina cruda en un tampón que tenga un pH mayor que el pKa de la cefazolina. El pH puede estar comprendido entre 3 y 6,5, siendo el pH preferido  $\pm 0,5$  unidades de pH del pKa del ácido carboxílico que se use para formar el anhídrido mixto con ácido tetrazolacético. Además, el pH preferido es tal que la cefazolina esté ionizada al 99% aproximadamente, es decir, un pH de  $4,5 \pm 0,5$  unidades de pH. Se conocen muchos tampones útiles, tales como tampones de formiato o acetato, y la elección y preparación de tampones con esta variación de pH, y sujetos a la elección de aniones que se describe más adelante, están dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

Alternativamente, si la reacción de acilación se efectúa en medio acuoso, cualquier codisolven

te orgánico puede ser eliminado por evaporación o extracción, y se añade acetato sódico sólido para hacer a la solución acuosa 0,2M en acetato. La solución acuosa residual se ajusta a pH 4,0-4,8, si es necesario, con un ácido o base normal. El pH depende del ácido carboxílico usado en el anhídrido mixto, de que se use un tratamiento previo de extracción, y del tipo de técnica de absorbente, a saber en columna o en suspensión. El pH preferido es  $\pm 0,5$  unidades de pH del pKa del ácido carboxílico usado en el anhídrido mixto. El concentrado acuoso se puede someter luego a extracción con un disolvente orgánico, tal como acetato de isobutilo y/o cloruro de metileno, para eliminar la mayoría del ácido carboxílico usado en el anhídrido mixto y ciertos materiales de partida sin reaccionar. La solución acuosa resultante se trata luego con la resina, como aquí se describe.

Se ha hallado que ciertos aniones retrasan la adsorción de los alquitranes, y por tanto afectan adversamente a la eficacia del procedimiento. El grado de este efecto adverso puede variar en cada cefalosporina. Son ejemplos de esos aniones fosfato, sulfato, tartrato, citrato y etiléndiaminotetraacetato. Entre los aniones que no tienen ese efecto adverso se incluyen acetato, propionato, benzoato, formiato y cloruro

ro. Otros aniones que se podrían elegir para usar en el tampón pueden ser ensayados, en cuanto a la existencia de este efecto adverso, haciendo una experiencia a pequeña escala y observando los resultados, todo lo cual está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. El grado del efecto adverso se puede ensayar de la misma manera.

La solución de cefazolina se dispone en una columna de la resina y se eluye. La cantidad de resina usada es generalmente de 5 a 30 ml por gramo de cefazolina cruda. La proporción entre resina y cefalosporina puede variar en cada cefalosporina; sin embargo, la proporción apropiada es fácilmente determinada por los expertos en la técnica. Entre los eluyentes se incluyen tampones, soluciones de acetato sódico, soluciones de cloruro sódico o similares. En general, los tampones serán los mismos que eran útiles para preparar la solución de cefazolina a partir de cefazolina sólida, como se ha descrito antes. Un eluyente típico es ácido acético 0,1 M, acetato 0,1 M y cloruro sódico 0,2 M. La eficacia del procedimiento respecto a la máxima recuperación de cefazolina y máxima eliminación de alquitranes se puede ajustar por variación de la fuerza iónica y naturaleza del anión en el eluyente. A medida que se aumenta la fuerza iónica se eli-

minan más alquitranes, y tienen lugar pérdidas aumentadas de cefazolina.

5 La mayor parte del producto se eluye con los primeros varios volúmenes de columna del eluyente. Esta solución se puede pasar luego por una columna corta de alúmina, para eliminar las trazas finales de impurezas coloreadas. Dependiendo de la cantidad de impurezas presentes en la cefalosporina cruda, esta etapa puede no ser necesaria. La cefazolina se aísla acidificando la solución hasta aproximadamente pH 1,5 con un ácido mineral inorgánico o similar, enfriando y filtrando el producto puro. Se puede hacer una adición de isopropanol a la solución ácida para aumentar la pureza del producto y disminuir el color.

15 También se puede usar el método de suspensión para poner en contacto la resina con la cefalosporina. La resina se añade directamente a la solución acuosa cruda de cefazolina, y la mezcla se agita durante un cierto período de tiempo mientras se ajusta lentamente el pH a  $4,5 \pm 0,5$  unidades de pH. La mezcla se dispone en una columna in situ, y se eluye con varios volúmenes de columna de eluyente. el método de suspensión comprende también añadir la solución a la resina ya en una columna, agitar la mezcla para efectuar un mezclado completo, ajustar el pH como antes,

con agitación, dejar que la resina sedimente, y eluir luego como antes. El producto se puede hacer pasar luego por una columna de alúmina, y se aísla de la misma manera que en el método en columna. El método de suspensión aumenta la eficacia y reproducibilidad del procedimiento de adsorción en resina. Sin embargo, puede ser necesaria una extracción preliminar, como se ha descrito antes, para eliminar las impurezas que están presentes procedentes de la reacción.

Las resinas XAD y la alúmina se pueden mezclar entre sí en el método de suspensión, o se pueden usar como dos columnas en serie. La combinación de los dos adsorbentes en el método de suspensión parece dar resultados mejorados, lo que indica que está teniendo lugar un efecto sinérgico. La eficacia mejorada se observa particularmente si se añaden los adsorbentes a una solución de cefazolina cuyo pH sea aproximadamente 1,25-2,25 unidades mayor que el pH del tampón eluyente que se usará. Luego se ajusta lentamente la mezcla a aproximadamente el pH del tampón, se agita, se carga como rellano en una columna, y se eluye como se ha descrito antes. Un método alternativo que también da una eficacia mejorada consiste en añadir los adsorbentes a la solución de cefazolina, ajustar a pH 6-6,5, agitar, y ajustar lentamente a pH 4-4,5. También, se

5 pueden añadir los adsorbentes a una solución de cefazolina con un pH de 6-6,5, y ajustar luego lentamente a pH 4-4,5, con agitación. Cuando se usa cualquiera de los métodos de ajuste de pH aquí descritos, los adsorbentes pueden ser la resina y alúmina mezcladas, o la resina sola.

10 Como alternativa al uso de una columna, la cefazolina pura puede ser aluída de los adsorbentes haciendo pasar disolvente sobre un lecho de filtro del adsorbente. Por ejemplo, en el método de suspensión se puede recoger el adsorbente sobre un aparato de filtración, y hacer pasar el aluyente a través del mismo, ya sea por flujo por gravedad o con ayuda de vacío o presión.

15 Las resinas pueden ser regeneradas y usadas repetidamente. La regeneración se efectúa lavando la resina con hidróxido sódico 0,2 M, metanol acuoso al 50%, o hidróxido sódico al 0,1% en metanol acuoso al 50%. La resina se enjuaga concienzudamente  
20 con agua, y luego con el eluyente, antes de ser usada de nuevo.

25 El procedimiento aquí expuesto da rendimientos mejorados de productos más puros que los que se obtienen por los viejos procedimientos, tales como extracción con disolvente, decoloración y similares.

Por ejemplo, la cefazolina se obtiene con un rendimiento global de aproximadamente 55-60% a partir de ácido 7-amino-3-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico crudo, cuando se usan los viejos procedimientos de purificación. Cuando se usa el procedimiento de la invención, el rendimiento global a partir de ácido 7-amino-3-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico crudo es de aproximadamente 80-85%. Además del rendimiento mejorado obtenido con el nuevo procedimiento, el material obtenido tiene mayor pureza, y la etapa de purificación preliminar del material de partida puede ser eliminada.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, pero no se han de interpretar como limitativos del ámbito de la misma. En los ejemplos se usan los siguientes tampones:

Tampón A: acetato sódico 0,1 M, ácido acético glacial 0,1 M, NaCl 0,2 M

Tampón B: acetato sódico 0,1 M, ácido acético glacial 0,1 M, NaCl 0,1 M

#### EJEMPLO 1

Se elimina en vacío la acetona a partir de una mezcla de reacción de acilación de agua-acetona, y el residuo acuoso (50 ml, que contiene 4 g de ce

fazolina) se hace 0,2 M en acetato sódico. La solución se ajusta a pH 4,3-4,8 con HCl diluído, y se dispone en una columna de XAD-8 (75 ml). Se eluye la columna con tampón A, y el aluato se hace pasar por una columna corta de alúmina neutra. La solución resultante se diluye con un tercio de su volumen de isopropanol, y se acidifica con HCl hasta pH 1,4-1,6. El precipitado de cefazolina blanca se recoge y se seca.

#### EJEMPLO 2

Se disponen en una bureta de 100 ml alúmina neutra (6 ml), una capa de lana de vidrio, y luego resina XAD-8 (48 ml), y se lava la columna con agua y luego con tampón B. Se disuelve cefazolin cruda (1,816 g, 4 milimoles) en tampón B, con ayuda de bicarbonato sódico (275 mg), y se dispone en la columna. Se aluye sal sódica pura de cefazolina usando tampón B (185 ml). La acidificación del eluato con HCl diluído de cefazolina (1,172 g).

#### EJEMPLO 3

Se lava resina (XAD-7,30 ml) con metanol y agua, y se carga una suspensión en una columna, y se vuelve a lavar con agua. Se dispone en la columna una solución de cefazolina cruda (454 mg), acetato sódico trihidratado (300 mg) y bicarbonato sódico (60 mg), en una cantidad suficiente de agua para tener y ml

de solución. La elución con acetato sódico al 1% da buena separación de las impurezas polares coloreadas y de cefazolina. Las fracciones se ensayan en cuanto a la presencia de cefazolina, por acidificación de cada una de ellas a pH 1,3-1,6 con HCl diluído.

La repetición del anterior método usando resina XAD-8 también proporciona separación de las impurezas.

El uso de resina XAD-8 y de un tampón de acetato (pH 4,7; acetato sódico 0,6 M, ácido acético glacial 0,5 M) para tres volúmenes de columna, seguido por acetato sódico al 1% en el método anterior, da una separación mejorada.

#### EJEMPLO 4

Se disuelve cefazolina cruda (2,3 g) en tampón A (20 ml) con ayuda de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sólido, para dar una solución que tiene pH 6,5. Se añade lentamente XAD-8 (10 ml), y la solución se ajusta a pH 4,8 por adición lenta de HCl diluído. Se añade lentamente alúmina neutra (4 g) a la mezcla, mientras se mantiene el pH a 4,8. Tras agitar durante 15 minutos la mezcla se carga en una columna por encima de 4,5 g de alúmina neutra, y se eluye con 2 volúmenes de columna de tampón A y luego acetato sódico al 2%. El eluato se acidifica hasta pH 1,8 con HCl diluído, y la cefa-

zolina purificada se recoge: 1,9 g.

#### EJEMPLO 5

Una mezcla de reacción de acilación de agua-acetona (44 ml) se diluye con agua hasta un volumen de 75 ml, se estratifica con un volumen igual de acetato de isobutilo, y se ajusta a pH 4,4. La fase acuosa separada se hace 0,2 M en acetato sódico, y se ajusta a pH 6,5 con carbonato sódico. Se añade resina (XAD-8, 150 ml) y se agita, y la mezcla se ajusta a pH 4,4-4,8 con HCl diluido. La suspensión se dispone en una columna y se eluye con tampón A. El eluato se hace pasar por una pequeña columna de alúmina, se diluye con un tercio de su volumen de isopropanol, y se ajusta a pH 1,5. Se recoge la cefazolina pura.

15

#### EJEMPLO 6

La mezcla de reacción cruda se obtiene de la acilación de ácido 7-amino-3-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico (118 g, 87,6% de pureza) con ácido tetrazolacético por el método del anhídrido mixto, y el codisolvente acetona se elimina por destilación en vacío. El residuo acuoso (1183 g) se estratifica con acetato de isobutilo (1,2 litros), se ajusta a pH 4,1 con HCl concentrado, y luego, tras separación de las capas, se somete a extracción con cloruro de metileno (1,2 litros). La solución

25

acuosa se pone en contacto con XAD-8 regenerada (1152 ml, previamente lavada con tampón A), y se ajusta a pH 6,0-6,5 con trietilamina. La suspensión agitada se ajusta lentamente a pH 4,6 con HCl concentrado. Tras  
5 agitar durante 20 minutos, la suspensión se carga en una columna que se conecta de manera que el eluato pa se a una segunda columna que contiene alúmina (576 g). Se pasa tampón A (7,5 litros) por las columnas, y se recoge un total de 10,1 litros de eluato. Se puede  
10 usar vacío o presión para mantener un caudal de aproximadamente 4 litros por hora por litro de resina. Se añade isopropanol (2 litros) al eluato, y la solución se ajusta a pH 2 con un ácido mineral. Tras enfriar, la cefazolina se recoge y seca, 110,4 g (rendimiento  
15 del 81,2%).

#### EJEMPLO 7

Se disuelve ácido 3-(5-metil-1,3,4-tia-  
diazol-2-iltiometil)-7-D(-)mandelamido-3-cefem-4-carbo  
xílico crudo (10 g) en tampón A (50 ml) con ayuda de  
20 bicarbonato sódico (1,76 g). La solución se ajusta a pH 6,3 con bicarbonato sódico, y luego se añade XAD-8 (100 ml). La suspensión agitada se ajusta lentamente a pH 4,7 por adición de HCl. La suspensión se dispone en una columna y se eluye con tampón A. El eluyente se pa  
25 sa directamente a través de una columna de alúmina (15g).

y luego se acidifica hasta pH 2. El producto purificado se recoge y seca.

#### EJEMPLO 8

5 Se suspende ácido 7-amino-3-(5-metil-1, 3,4-tiadiazol-2-il)-3-cefem-4-carboxílico (40 g) en acetato sódico 0,25 M (400 ml), y se efectúa la disolución por adición de un equivalente de trietilamina (16 ml). La solución se vuelve a ajustar a pH 8,5 con HCl 3N, sin hacer que precipite nada de material. La  
10 solución (635 ml) se dispone en una columna de XAD-2 (600 ml) dispuesta de manera que el eluato de esa columna pasa directamente a una columna de alúmina. La columna de XAD-2 se eluye con una solución de acetato sódico 0,25 M que se ajusta a pH 8,5 con trietilamina.  
15 Los eluatos se recogen en fracciones y se acidifican, y el compuesto precipitado purificado se recoge.

#### EJEMPLO 9

Se disolvió ácido 7-aminocefalosporánico (2 g, grado de pureza de 78,6%, color amarillo oscuro) en 20 ml de dihidrógeno fosfato potásico 1 M, con  
20 ayuda de trietilamina; la solución final tenía pH 6,0. La solución cruda se hizo pasar por una columna que contenía 25 ml de XAD-2. El ácido 7-aminocefalosporánico pasó en los dos primeros volúmenes de columna de eluyente.  
25 te. Las fracciones se combinaron y acidificaron a pH

3,6, para precipitar 1,304 g de un producto beige claro, con un grado de pureza de 89,2%.

5 La presente solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, el 23 de Enero de 1974, bajo el Nº 435,911, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

#### REIVINDICACIONES

15

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

20

25 1a.- Procedimiento para purificar una cefalosporina que contiene un ácido carboxílico libre, que comprende: (a) poner en contacto una solución acuosa de dicha cefalosporina, teniendo dicha solución un

22.2.75

pH de 3 a 6,5, con un adsorbente, siendo dicho adsorbente una resina polímera no iónica macrorreticular, siendo dicha resina un copolímero de estireno-divinilbenceno reticulado o un polímero de éster acrílico reticulado, y eluir dicha cefalosporina de dicho adsorbente con un eluyente, siendo dicho eluyente una solución acuosa que tiene un pH de 3 a 8,5; (b) acidificar los eluatos, que contienen la cefalosporina, hasta un pH menor que su pKa; y (c) recoger la cefalosporina precipitada resultante.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, que comprende: (a) o bien poner en contacto una solución acuosa de dicha cefalosporina, teniendo dicha solución un pH de 3 a 6,5, con una mezcla de adsorbentes, siendo dichos adsorbentes dicha resina y alúmina, y eluir dicha cefalosporina de dichos adsorbentes con dicho eluyente, o bien poner en contacto dicha solución acuosa de dicha cefalosporina con dicha resina, eluir dicha cefalosporina de la resina con dicho eluyente, y hacer pasar el eluato a través de alúmina; (b) acidificar los eluatos que contienen la cefalosporina, hasta un pH menor que su pKa; y (c) recoger la cefalosporina precipitada resultante.

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, donde la solución acuosa de la cefalosporina

se pone en contacto con una mezcla de los adsorbentes.

5 4a.- Procedimiento según la reivindicación 2a, donde la solución acuosa de la cefalosporina se pone en contacto con la resina, se eluye la cefalosporina de la resina con una solución acuosa tamponada a pH 3 a 8,5, y el eluato se hace pasar a través de alúmina.

10 5a.- Procedimiento según la reivindicación 4a, donde la resina es un copolímero de estireno-divinilbenceno reticulado.

6a.- Procedimiento según la reivindicación 4a, donde la resina es un polímero de éster acrílico reticulado.

15 7a.- Procedimiento según la reivindicación 2a, donde la cefalosporina es cefazolina, cefalotina, cefaloridina, cefaloglicina, cefalexina, cefradina, ácido 7-cianoacetamidocefalosporánico, ácido 7-(4-piridiltioacetamido)cefalosporánico, ácido 7-mandelamido-3-(1-metiltetrazol-5-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico, ácido 7-(3-sidnonacetamido)-3-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico, ácido 7-aminocefalosporánico, ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico, ácido 7-amino-3-(1-metiltetrazol-5-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico, y ácido 7-amino-3-(5-me-

20

25

til-1,3,4-tiadiazol-2-iltiometil)-3-cefem-4-carboxi-  
lico.

8a.- Procedimiento según la reivindi-  
cación 6a, donde la cefalosporina es cefazolina.

5 9a.- Procedimiento según la reivindi-  
cación 8a, donde la resina es un polímero de éster  
acrílico reticulado, que tiene un tamaño medio de po-  
ros de 250 Å.

10 10a.- Procedimiento según la reivindi-  
cación 9a, que comprende poner en contacto la solu-  
ción acuosa de cefazolina, que tiene un pH 4-6,5, con  
la resina, ajustar el pH a 6 a 6,5, ajustar el pH a  
4-4,6, y eluir con el eluyente.

15 11a.- Procedimiento según la reivindi-  
cación 9a, que comprende poner en contacto la solu-  
ción acuosa de cefazolina, que tiene un pH 6-6,5, con  
la resina, ajustar el pH a 4-4,6, y eluir con el elu-  
yente.

20 12a.- Procedimiento según la reivindica-  
ción 10a, donde el eluyente es un tampón de acetato  
que es acetato sódico 0,1 M, ácido acético glacial 0,1  
M, y cloruro sódico 0,2 M.

25 13a.- Procedimiento según la reivindi-  
cación 11a, donde el eluyente es un tampón de acetato  
que es acetato sódico 0,1M, ácido acético glacial 0,1M,

y cloruro sódico 0,2M.

5  
10  
15  
20  
25

14<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 2<sup>a</sup>, que comprende: (a) poner en contacto una solución acuosa de cefazolina, que tiene un pH de 4 a 6,5, con un polímero de éster acrílico reticulado que tiene un tamaño medio de poros de 250 Å; (b) ajustar la suspensión a pH 4 a 4,6; (c) eluir la cefazolina de la resina con un tampón de acetato que es acetato sódico 0,1M, ácido acético glacial 0,1M, y cloruro sódico 0,2M; (d) pasar el eluato por una columna o un lecho de alúmina; (e) acidificar la fracción que contiene cefazolina del eluato de la alúmina, hasta pH 1,5 a 2, con un ácido mineral; y (f) recoger el precipitado de cefazolina resultante.

15  
20

15<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1<sup>a</sup>, donde la resina es un copolímero de estireno-divinilbenceno reticulado.

20  
25

16<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1<sup>a</sup>, donde la resina es un polímero de éster acrílico reticulado.

25  
30

17<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 16<sup>a</sup>, donde la resina es un polímero de éster acrílico reticulado, con un tamaño medio de poros de 250 Å.

30  
35

18<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 17<sup>a</sup>, donde la cefalosporina es cefazolina.

19<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1<sup>a</sup>, que comprende: (a) poner en contacto una solución acuosa de cefazolina, que tiene un pH de 4 a 6,5, con un polímero de éster acrílico reticulado, que  
5 tiene un tamaño medio de poros de 250 Å; (b) ajustar la suspensión a pH 4 a 4,6; (c) eluir la cefazolina de la resina con un tampón de acetato que es acetato sódico 0,1M, ácido acético glacial 0,1M, y cloruro sódico 0,2M; (d) acidificar la fracción que contiene cefazolina del aluato, hasta pH 1,5 a 2, con un ácido mineral; y (e) recoger el precipitado de cefazolina resultante.  
10

20<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1<sup>a</sup>, donde la cefalosporina es cefazolina, cefalotina, cefaloridina, cefaloglicina, cefalexina, cefradina, ácido 7-cianoacetamidocefalosporánico, ácido 7-(4-piridiltioacetamido)cefalosporánico, ácido 7-mandelamido-3-(1-metiltetrazol-5-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico, ácido 7-(3-sidnonacetamido)-3-(5-etil-1,3,4-tiadiazol-2-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico, ácido 7-aminocefalosporánico, ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico, ácido 7-amino-3-(1-metiltetrazol-5-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico, y ácido 7-amino-3-(5-metil-1,3,3-tiadiazol-2-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico.  
15  
20  
25

