

434239

P. - 59.469 - 7

Case: S 16



Int. Cl.:

C07D // C12D

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION EN ESPAÑA por 20 años

a nombre de ALFA FARMACEUTICI S.p.A.

entidad italiana

establecida en Via Ragazzi del '99 n. 5, 40133 Bologna,
Italia

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA RECUPERACION DE CEFALOSPORI
NA G DE UN MEDIO ACUOSO"

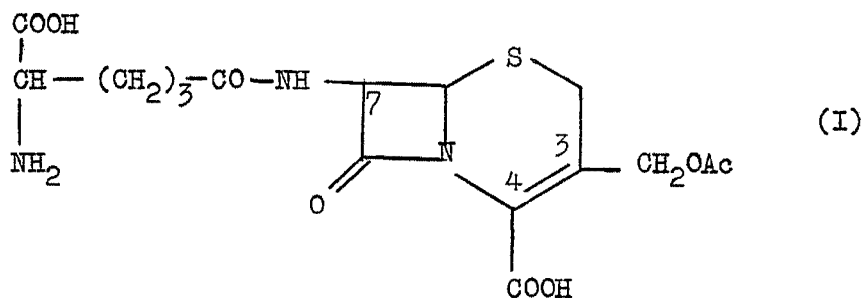
(Clase Internacional C12d, C07d)

29-1-75.



El presente invento se refiere a un procedimiento para la recuperación de cefalosporina C de soluciones acuosas, y particularmente de caldos de fermentación, en forma de un derivado que se extrae fácilmente con disolventes esencialmente inmiscibles con el agua. El invento se refiere también a la preparación del ácido 7-aminocefalosporánico a partir de los derivados así recuperados.

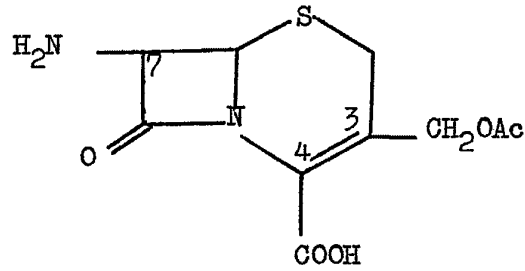
La cefalosporina C, que tiene la fórmula:



ha adquirido considerable importancia en quimioterapia. No solamente posee una cierta, aunque limitada, actividad antibiótica, sino también es un material de partida importante para la preparación del ácido 7-aminocefalosporánico (denominado en lo sucesivo 7-AAC), también conocido por el nombre semi-sistemático: ácido 7 β -amino-3-acetoximetil-cef-3-em-4-carboxílico, y que tiene la fórmula:

29-1-75.

7 FEB 1975



(II)

5

En ambas fórmulas anteriores, el símbolo Ac representa el grupo acetilo-CO.CH₃. El 7-AAC es útil como intermedio en la preparación de muchas cefalosporinas semi-sintéticas.

10

La cefalosporina C se prepara a escala industrial por fermentación de microorganismos del género Cephalosporium en un medio nutriente acuoso. Al final de la fermentación, la cefalosporina C está presente en el caldo junto con muchas otras sustancias, de las cuales algunas son sustancias nutrientes originalmente presentes en el medio y otras son productos de fermentación. Por consiguiente el aislamiento de cefalosporina C a partir de dichos caldos de fermentación ha presentado, desde hace tiempo, un problema muy difícil.

15

Los métodos empleados ampliamente para este aislamiento implican procedimientos caros y de absorción y elución complicadas empleando resinas que incluyen resinas de cambio iónico. Sin embargo, estos métodos tienen muchas desventajas, que incluyen: gran complejidad de ope

25

29-1-75.

10 FEB 1975

5 ración; gran coste de inversión para las columnas de re
sina; operaciones que consumen tiempo, que pueden impli
car degradación parcial de la cefalosporina C; requeri
miento de grandes cantidades de disolventes que no siem
pre son recuperables; y bajos rendimientos de absorción.
También se han descrito cierto número de métodos quími-
cos para el aislamiento de la cefalosporina C de los
caldos de fermentación: estos consisten en tratar los
caldos filtrados con reaccionantes capaces de reaccio-
nar con el grupo amino de la cefalosporina C, extrayén
dose luego con disolventes adecuados los derivados de
cefalosporina C. Sin embargo, el procedimiento adopta-
do hasta ahora no ha sido completamente satisfactorio
ya que son bajos tanto los rendimientos como la pureza
de los derivados aislados del disolvente. Se cree que
esto es debido al hecho de que muchas sustancias presen
tes en los caldos de fermentación contienen grupos amino
capaces de reaccionar con el reaccionante para producir
derivados que son extraídos por el disolvente junto con
los derivados de cefalosporina C.

20 Se ha descubierto ahora una clase de deri
vados de cefalosporina C que pueden aislarse de los cal
dos de fermentación y que son fácilmente recuperables
por extracción con un disolvente esencialmente inmisci-
ble con el agua, con lo cual se reduce sustancialmente

25
29-1-75.



la recuperación de derivados similares de otras sustancias que contienen grupos amino presentes en los caldos. Esta clase de derivados tiene la ventaja adicional de que pueden emplearse directamente para producir 7-AAC sin requerir conversión intermedia en cefalosporina C. Estos derivados son las sulfonamidas.

Así, el presente invento consiste en un procedimiento para la recuperación de la cefalosporina C en forma de una sulfonamida desde un medio acuoso, por ejemplo un caldo de fermentación, que contiene cefalosporina C, procedimiento que comprende: tratar dicho medio con un cloruro de sulfonilo de fórmula $R-SO_2Cl$ (en la cual R es un grupo alcohilo sustituido o no sustituido, preferiblemente no sustituido, que tiene de 4 a 10 átomos de carbono, o un grupo arilo sustituido o no sustituido, por ejemplo fenilo o naftilo) para convertir la cefalosporina C en la sulfonamida correspondiente; y extraer la sulfonamida con un disolvente esencialmente inmisible con el agua.

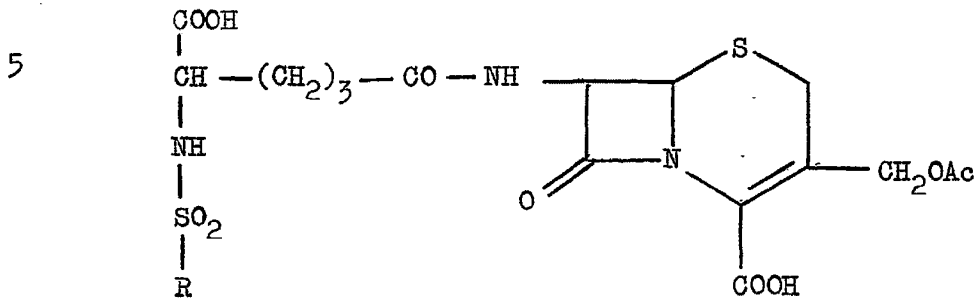
Los sustituyentes en el grupo R, particularmente cuando R es un grupo arilo sustituido son preferiblemente uno o más de: grupos alcohilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, grupos alcoxi que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, átomos de halógeno (por ejemplo cloro, bromo, yodo) y grupos nitro.

29-1-75.



-7 FEB. 1975

Los derivados recuperados se cree que tie
nen la fórmula



en la cual R es como se ha definido antes.

15

Por "disolvente esencialmente inmiscible con el agua" se entiende de un disolvente que es o inmiscible con el agua o que, si es parcialmente miscible, es lo suficientemente inmiscible para permitir se parar el disolvente de la fase acuosa.

20

El medio acuosos que contiene la cefalosporina C puede ser el caldo producido por fermentación, preferiblemente después de liberar el caldo del micelio por filtración. Si se desea, además de liberarse del micelio por filtración, el caldo también puede liberarse de otras ciertas impurezas por tratamiento con ácidos y/o con disolventes, por ejemplo acetona, de acuerdo con

25

procedimientos conocidos. También es posible emplear cal

29-1-75.



dos de fermentación purificados que han sido concentra-
dos por técnicas convencionales, por ejemplo por concen-
tración a vacío o por absorción de resina y subsiguien-
te elución.

5 El procedimiento del presente invento tie-
ne muchas ventajas sobre procedimientos similares cono-
cidos para la recuperación de cefalosporina C de los
caldos de fermentación empleando derivados diferentes.
Una de las ventajas principales es que el procedimiento
10 del presente invento da buenos resultados incluso si es
baja la concentración de cefalosporina en el caldo de
fermentación. Este carácter único hace al procedimiento
del invento ampliamente aplicable a escala industrial.

Ejemplos de cloruros de sulfonilo que pue-
15 den emplearse en el presente invento son: cloruro de
toluen-p-sulfonilo; cloruro de dimetilbencenosulfonilo;
cloruro de p-isopropilbencenosulfonilo; cloruro de butil-
bencenosulfonilo; cloruro de β -naftalenosulfonilo; y
cloruro de p-nitrobencenosulfonilo. Estos cloruros de
20 sulfonilo producen respectivamente, las sulfonamidas
siguientes de cefalosporina C: toluen-p-sulfonamida de
cefalosporina C; dimetilbencenosulfonamida de cefalospo-
rina C; p-isopropilbencenosulfonamida de cefalosporina
C; butilbencenosulfonamida de cefalosporina C; β -nafta-
25 lenosulfonamida de cefalosporina C; y p-nitrobencenosul-

29-1-75.

-7A6-134

fonamida de cefalosporina C. De estos, son nuevos com-
puestos la p-isopropilbencenosulfonamida de cefalospori
na C y la β -naftalenosulfonamida de cefalosporina C, y
dichos compuestos también forman parte del presente in-
vento.

5

Para permitir la separación completa de
la cefalosporina C del medio acuoso, la cantidad mínima
de cloruro de sulfonilo empleada debe ser 1 mol por mol
de cefalosporina C en el medio acuoso; sin embargo, se
10 prefiere emplear más de 1 mol de cloruro de sulfonilo
por mol de cefalosporina C y particularmente se prefie
re emplear de 3 a 10 moles por mol de cefalosporina C.
El procedimiento puede llevarse a cabo a cualquier tem
peratura conveniente, aunque normalmente a una tempera
15 tura de 0°C a 40°C. La temperatura elegida debe selec
cionarse para alcanzar una velocidad satisfactoria de
la reacción aunque evitando la degradación de cefalos
porina C y sus derivados. Por consiguiente se prefiere
llevar a cabo el procedimiento del invento a una tempe
20 ratura de 10°C a 20°C.

15

20

La reacción del cloruro de sulfonilo con
cefalosporina C produce cloruro de hidrógeno como sub
producto y este se separa preferiblemente durante la
reacción. La separación de este cloruro de hidrógeno se
25 consigue mejor llevando a cabo la reacción en presencia

25

29-1-75.



de un material capaz de captar el ácido. Particularmente se prefiere que el pH del medio de reacción durante la reacción se mantenga a un valor superior a 7, y preferiblemente en el intervalo de 7,5 a 9,5, por medio de uno o más compuestos básicos, tales como hidróxidos de metal alcalino, carbonatos o bicarbonatos, o bases orgánicas. Más preferiblemente, el pH del medio de reacción se mantiene en los valores indicados por medio de un agente tampón, tal como bórax. Después de hacer reaccionar la cefalosporina C con el cloruro de sulfonilo, el medio de reacción acuoso se extrae luego empleando un disolvente que es inmiscible o esencialmente inmiscible con el agua y en el que es soluble la sulfonamida de cefalosporina C. La extracción de la sulfonamida de cefalosporina C se lleva a cabo preferiblemente a un pH inferior a 7, más preferiblemente a un pH de 1 a 4.

Ejemplos de disolventes adecuados para empleo en la extracción son: los ésteres de alcohol inferior de ácidos alifáticos inferiores, tales como acetato de etilo, acetato de propilo, y acetato de butilo; alcoholes que tienen al menos 4 átomos de carbono, tales como n-butanol; las di-(alcohol inferior)etonas, tales como metilisobutilcetona; ciclohexanona; e hidrocarburos halogenados, tales como cloruro de metileno y cloroformo. Por "alcohol inferior" se entiende un gru-

29-1-75.



po alcoholilo que tiene de 1 a 5 átomos de carbono y "ácido alifático inferior" ha de ser interpretado correspondientemente. El ácido alifático inferior contiene preferiblemente 2 ó 3 átomos de carbono.

5 El derivado de sulfonamida de cefalosporina C puede recuperarse del extracto orgánico por evaporación del disolvente orgánico, preferiblemente a presión reducida. El derivado de sulfonamida puede luego convertirse en una sal escasamente soluble, por ejemplo

10 en una sal de metal alcalino o en una sal de una base orgánica. La conversión en una sal de metal alcalino, por ejemplo la sal de sodio, puede conseguirse por disolución del residuo después de evaporación en un disolvente tal como n-butanol, al que se añade gradualmente una

15 solución de 2-etilhexanoato de sodio en n-butano a un pH final de 5 a 6. La mezcla se enfría luego a 0-5°C durante algunas horas, después de lo cual se separa por filtración la sal de sodio sólida de la sulfonamida de cefalosporina C, se lava y se seca a baja temperatura a

20 presión reducida. Alternativamente, puede prepararse una sal de una base orgánica por adición de un compuesto tal como: quinoleína; ciclohexilamina; 5-etil-2-metilpiridina, 2-picolina; 3-picolina; 4-picolina; N-etilmorfolina; N-metilmorfolina; 2,6-lutidina; N,N-dietilciclohexilamina; hexametilentetramina; N,N-dietilbencilamina; o N,N-

25

29-1-75.



-dibenciletildiamina.

Los derivados de sulfonamida de cefalosporina C, bien en forma de un ácido libre o en forma de una sal, pueden emplearse directamente para la preparación de 7-AAC. Este procedimiento puede llevarse a cabo empleando técnicas conocidas y comprenderá en general las etapas siguientes:

- (a) protección del grupo ácido carboxílico por formación de un éster.
- (b) halogenación del éster para dar el correspondiente haluro de imino.
- (c) reacción del haluro de imino con un alcohol alifático inferior para dar el correspondiente imino-éter, y
- (d) hidrolizar el imino-éter en condiciones ácidas para dar 7-AAC.

De acuerdo con el presente invento, se obtienen rendimientos más altos en 7-AAC, referidos a la cefalosporina C, si los derivados de sulfonamida de cefalosporina C de partida se purifican antes de la conversión en 7-AAC por medio de resinas de cambio iónico.

Aunque el invento se ha descrito con referencia al aislamiento de la cefalosporina C propiamente dicha, se apreciará que el invento es igualmente aplicable al aislamiento de otros derivados de cefalosporina

29-1-75.



-7 FEB. 1975

C que tienen sustituyentes diferentes en las posiciones 3 y 4, es decir en los que el grupo CH_2OAc en la posición 3 ha sido reemplazado por otro grupo (generalmente un grupo aciloximetilo o alcoximetilo sustituido o no sustituido) y/o en los que el grupo ácido carboxílico en la posición 4 ha sido reemplazado por otro grupo, generalmente un grupo éster, o en los que las posiciones 3 y 4 están unidas por medio de un átomo de oxígeno de lactona. La necesidad de aislar tales derivados adicionales puede surgir si las conversiones químicas se llevan a cabo en la cefalosporina C antes de su aislamiento completo del caldo de fermentación.

El invento se ilustra adicionalmente con referencia a los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1

2000 ml de acetona se añadieron a 2000 ml de una solución acuosa que contenía 14,45 g de dihidrato de sodio de cefalosporina C, y el pH se elevó a 8,5 por adición de hidróxido de sodio acuoso al 30%. Durante 30 minutos se añadieron con agitación 17,4 g de cloruro de toluen-p-sulfonilo disuelto en 100 ml de acetona, mientras se mantenía el pH en 8,5 con hidróxido de sodio acuoso al 30%. La agitación se mantuvo durante 1 hora más. El pH se ajustó entonces a 7 y la acetona se evaporó a vacío a 30°C.

29-1-75.



-7 FEB 1975

Se añadieron 1000 ml de metilisobutilcetona (MIBC) y el pH se disminuyó a 2,0 por adición de ácido clorhídrico concentrado con agitación. Se añadió cloruro de sodio y se separó la capa orgánica. La capa acuosa se extrajo luego con tres porciones de MIBC, cada una de 600 ml. Los extractos se reunieron y secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y el disolvente se evaporó luego bajo vacío a 30°C. Al aceite residual disuelto en 150 ml de n-butanol se añadieron 24 ml de una solución de 2-etilhexanoato de sodio 2,6 molar en n-butanol, hasta un pH final de 5,5. Después de dejar la mezcla toda la noche a baja temperatura, el precipitado que se formó se separó por filtración, se lavó con éter y se secó a vacío.

Se obtuvieron 15,8 g de la sal de sodio de toluen-p-sulfonamida de cefalosporina C, que tenía una concentración del 87,1%. Esto corresponde a un rendimiento de 73,5%.

Ejemplo 2

Un caldo de fermentación que contenía cefalosporina C se acidificó, filtró y mezcló con un volumen igual de acetona y se filtró otra vez. 2.000 ml de la solución resultante, que tenía un contenido de cefalosporina C (expresado como dihidrato de sal de sodio) de 1730 mcg/ml se llevó a un pH de 8,8 ± 0,2 por adición

25
29-1-75.



-7 FFA 1975

de hidróxido de sodio acuoso al 20%. Se añadió luego con
agitación durante 5 minutos una solución de 8,3 g de
cloruro de toluen-p-sulfonilo en 50 ml de acetona. La
agitación se continuó durante 90 minutos más, mientras
5 que el pH se mantuvo al mismo valor con hidróxido de so-
dio acuoso al 20%. El pH se ajustó luego a 7,0 y la ace-
tona se evaporó bajo vacío a 30°C. Se añadieron 300 ml
de MIBC y el pH se disminuyó a 2,0 por adición de áci-
do clorhídrico 5 N. La fase orgánica se separó y la fa-
10 se acuosa se extrajo con 5 porciones de MIBC de 100 ml.
Los extractos orgánicos se reunieron, se secaron sobre
sulfato de sodio anhidro y se concentraron bajo vacío
a 35°C. El aceite residual se disolvió luego en 70 ml
de n-butanol y el valor del pH se ajustó a 6,5 con 15
15 ml de una solución de 2-etilhexanoato de sodio en n-bu-
tanol 1,84 molar. Después de dejar la mezcla toda la
noche a baja temperatura, el precipitado formado se
filtró, se lavó con éter y se secó bajo vacío, produ-
ciendo 7,94 g de la sal de sodio de toluen-p-sulfonamida
20 de cefalosporina C, que tenía una concentración espec-
trofotométrica del 42%. El rendimiento fue 73%.

El mismo procedimiento anteriormente des-
crito, con la única diferencia que el pH de la mezcla
de reacción se mantuvo en aproximadamente 9 por medio
25 de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ en lugar de NaOH, dio con un rendimien-

29-1-75.

-7 FEB 1975

y secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y el disolvente se evaporó luego bajo vacío a 35°C.

5 Al aceite residual, disuelto en 40 ml de n-butanol, se añadieron 6,6 ml de una solución 1,86 molar de 2-etilhexanoato de sodio en n-butanol, ajustando el pH a 5,6. Después de dejarla toda la noche a baja temperatura, el precipitado resultante se filtró, se lavó con éter y se secó bajo vacío, produciendo 3,73 g de la sal de sodio de toluen-p-sulfonamida de cefalosporina C, que tenía una concentración de 40,3%. El rendimiento fue 65,2%.

Ejemplo 4

15 1000 ml de un caldo de fermentación filtrado se concentró bajo vacío a 35°C hasta un volumen de 280 ml. El contenido de cefalosporina C (expresado como dihidrato de sal de sodio) era de 10.910 mcg/ml. Se añadieron 280 ml de acetona, se separó por filtración el precipitado, se lavó con 40 ml de una mezcla de acetona y agua 1:1 y se desechó. Los líquidos de lavado se reunieron con la solución filtrada. El pH se elevó luego a 8,8 ± 0,2 por adición de hidróxido de sodio al 30% y se añadieron durante 3 horas 7,2 g de cloruro de toluen-p-sulfonilo disueltos en 50 ml de acetona, mientras se mantenía el pH entre 8,5 y 9 con adición de hidróxido de sodio al 30% y agitación. La agitación se

25
29-1-75.


-7 FEB. 1975

5 mantuvo durante una hora más mientras se mantenía el pH al mismo valor por adición de hidróxido de sodio al 30%. El pH se disminuyó luego hasta 7,0 por adición de ácido clorhídrico concentrado y la acetona se evaporó bajo vacío a 30°C. Se añadieron con agitación 100 ml de MIBC y el pH se disminuyó hasta 2,0 por adición de ácido clorhídrico concentrado.

10 Se separó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo cuatro veces con porciones de 50 ml de MIBC. Los extractos orgánicos se reunieron y secaron. El disolvente se evaporó luego bajo vacío y el aceite residual se disolvió en 80 ml de n-butanol, después de lo cual se añadió una solución de 2-etilhexanoato de sodio en n-butanol hasta un pH de 6,5. El precipitado que
15 se formó se recuperó y secó, produciendo 6,24 g (73%) de la sal de sodio de toluen-p-sulfonamida de cefalosporina C que tenía una concentración espectrofotométrica de 45,2%.

Ejemplo 5

20 1000 ml de un caldo de fermentación filtrado que tenía un contenido de cefalosporina C (expresado como dihidrato de la sal de sodio) de 3.300 mcg/ml se mezclaron con 1000 ml de acetona y el precipitado se separó por filtración. El pH de la mezcla se ajustó a
25 8,8 ± 0,2 y se mantuvo en este valor por adición de hi-

29-1-75.



dróxido de sodio acuoso al 30% mientras se añadía durante tres horas una solución de 7,2 g de cloruro de toluen-p-sulfonilo en 50 ml de acetona, después de lo cual la solución se agitó durante una hora más. El pH se disminuyó luego hasta 7,0 por adición de ácido clorhídrico concentrado y la acetona se evaporó bajo vacío. Luego se extrajo la solución a pH 2 con una porción de 200 ml de MIBC y 4 porciones de 100 ml cada una de MIBC. Los extractos orgánicos se lavaron con cuatro porciones, cada una de agua fría de 50 ml y los líquidos de lavado acuosos se extrajeron con 50 ml de MIBC.

Los extractos orgánicos reunidos se concentraron a vacío hasta 100 ml, y se añadieron 3,5 ml de quinoleína. Después de dejar toda la noche a baja temperatura el precipitado resultante se separó por filtración, se lavó con éter y se secó, produciendo 3,8 g de la sal de quinoleína de la toluen-p-sulfonamida de cefalosporina C que tenía una concentración espectrofotométrica de 68,5%. El rendimiento fue 53,5%.

Ejemplo 6

Un caldo de fermentación que contenía cefalosporina C se acidificó, filtró y mezcló con un volumen igual de acetona y se volvió a filtrar. 3000 ml del filtrado, que tenía un contenido de cefalosporina C (expresado como dihidrato de la sal de sodio) de 1750

25
29-1-75.



~~-7 FEB. 1975~~

mcg/ml, se ajustaron a pH 9,0 por adición con agitación de hidróxido de sodio al 30%, y luego se añadieron durante 5 minutos 12,6 g de cloruro de toluen-p-sulfonilo en 50 ml de acetona mientras se mantenía el pH a 9. La
5 solución se agitó durante 90 minutos a pH 9.

El pH se disminuyó entonces al 7,0 y la acetona se evaporó bajo vacío a 30°C. Después de extraer la solución a pH 2 con una porción de 700 ml de MIBC y con cuatro porciones de 200 ml de MIBC, los extractos orgánicos se reunieron y lavaron con 300 ml de agua. Los
10 líquidos de lavado acuosos se extrajeron con 150 ml de MIBC, que se añadieron luego a los otros extractos orgánicos. Los extractos orgánicos reunidos se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y luego se dividieron en tres
15 porciones iguales, que se trataron como sigue:

(A) El disolvente se evaporó de esta porción y el residuo se disolvió en 50 ml de n-butanol. Se añadieron luego 8 ml de una solución 1,84 molar de 2-etilhexanoato de sodio en n-butanol a un pH final de
20 5,6, produciendo 3,95 g de la sal de sodio de toluen-p-sulfonamida de cefalosporina C que tenía una concentración del 43,2%. El rendimiento fue 75%.

(B) A esta porción se añadieron 6,6 ml de la solución descrita antes de 2-etilhexanoato de sodio, a un pH final de 5,6. La suspensión resultante se con-
25
29-1-75.



-7 FEB. 1975

centró luego bajo vacío a 35°C hasta un volumen de 100 ml y, después de enfriar, se filtró el precipitado y secó, produciendo 3,85 g de la sal de sodio de toluen-p-sulfonamida de cefalosporina C que tenía una concen-
5 tración de 44,2%. El rendimiento fue 75%.

(C) El disolvente se evaporó de esta por-
ción y el residuo se disolvió en 40 ml de n-butanol,
después de lo cual se añadieron 2,45 ml de N-dimetilmor-
folina. Se separó el sólido alquitranoso resultante, se
10 trituró en éter y se secó bajo vacío produciendo 2,6 g
de la sal de N-metilmorfolina de toluen-p-sulfonamida
de cefalosporina C, que tenía una concentración de 55%.
El rendimiento fue de 57,5%.

Ejemplo 7

15 A 600 ml de un caldo purificado y concen-
trado que contenía 15.490 mcg/ml de cefalosporina C
(expresada como dihidrato de la sal de sodio) se aña-
dieron 500 ml de acetona. El pH de la mezcla resultan-
te se ajustó a un valor de 8 por adición de hidróxido
20 de sodio acuoso al 30% a 10°C, después de lo cual se
añadieron durante 3 horas 15 g de cloruro de toluen-p-
sulfonilo disuelto en 100 ml de acetona, mientras se
mantenía el pH a un valor de 8 por adición de hidróxi-
do de sodio al 30%. Después de agitación durante 90 mi-
25 nutos, la acetona se evaporó y la solución se extrajo

29-1-75.



-7 FEB. 1975

5 con una porción de 200 ml de MIBC y 2 porciones de 100 ml de MIBC. Los extractos reunidos se lavaron dos veces con una solución saturada de cloruro de sodio y luego el disolvente se separó por evaporación. El residuo se disolvió en n-butanol y se trató con una solución 3 molar de 2-etilhexanoato de sodio en n-butanol a un pH final de 5,5.

10 El precipitado resultante se filtró, se lavó con éter y se secó, dando 9,5 g (rendimiento 78,5%) de la sal de sodio de toluen-p-sulfonamida de cefalospo-
rina C que tenía una concentración del 85,1%.

Punto de fusión 149-153°C.

Punto de inflexión de absorción UV a 262 nm.

15 Picos de I.R. a 3440, 2960, 1765, 1655, 1610, 1528, 1398, 1230, 1158, 1090, 1025, 812 y 658 cm^{-1}

20 Por cromatografía en capa delgada, empleando como fase móvil una mezcla de iso-
propanol/metanol/tampón a pH 5,8 (125:25:6,5), se obtiene una mancha detectable a R_f 0,7 en forma de una mancha blanca en ca-
liente con J_2/NaN_3 .

Ejemplo 8

25 1000 ml de una solución acuosa que conte
29-1-75.



nía 4.800 mcg/ml de cefalosporina C (expresada como di-
hidrato de sal de sodio) se mezclaron con 1000 ml de
acetona, el pH se ajustó a 8,5-9 por adición de hidróxi-
do de sodio acuoso al 30% y, manteniendo el pH a este
5 valor, se añadió una solución de 6,7 g de cloruro de
p-isopropilbencenosulfonilo en 50 ml de acetona. La mez-
cla se agitó durante 90 minutos adicionales al mismo
pH, después de lo cual el pH se disminuyó hasta un valor
de 7 y la acetona se evaporó bajo vacío a 30°C. Luego se
10 redujo el pH adicionalmente a un valor de 2 y la solu-
ción se extrajo con una porción de 400 ml de MIBC y
tres porciones de 100 ml de MIBC. Los extractos orgáni-
cos reunidos se secaron y se separaron los disolventes
por evaporación. El residuo se disolvió luego en 80 ml
15 de n-butanol y se llevó a un pH de 6,5 por adición de
una solución 1,84 molar de 2-etilhexanoato de sodio en
n-butanol. El precipitado que se formó se filtró, se
lavó con éter y se secó, produciendo 6,4 g (75%) de la
sal de sodio de p-isopropilbencenosulfonamida de cefa-
20 losporina C, que tenía una concentración de 75,9%.

Picos de I.R. a 3430, 3380, 3050, 2960,
1755, 1655, 1600, 1540, 1400, 1230, 1160,
1090, 1030, 830, 750, 690, 650 cm^{-1} .

Ejemplo 9 -

25

Un caldo de fermentación que contenía ce

29-1-75.

10 FEB 1965

de fermentación, se mezclaron 335 ml del filtrado con 670 ml de acetona y se filtraron otra vez. A la solución, que contenía 1 g de la sal de sodio de cefalosporina C (como dihidrato), se añadió con agitación durante 5 minutos una solución de 3,85 g de cloruro de 2-naftalensulfonilo en 50 ml de acetona, mientras se mantenía el pH a 9,0 con hidróxido de sodio acuoso al 30%. Se continuó la agitación durante 2 horas más al mismo pH, después de lo cual el pH se disminuyó a 7,5 y la acetona se evaporó bajo vacío. El pH del residuo se redujo adicionalmente a 2 y el residuo se extrajo luego con una porción de 200 ml de MIBC y con tres porciones de 100 ml de MIBC. Los extractos orgánicos se reunieron y lavaron con 100 ml de agua y los líquidos de lavado acuosos se extrajeron con 50 ml de MIBC. Todos los extractos orgánicos reunidos se secaron y el disolvente se evaporó bajo vacío.

El residuo aceitoso se disolvió en 40 ml de n-butanol y se añadieron 6 ml de una solución 2 molar de 2-etilhexanoato de sodio en n-butanol, dando un pH final de 5,5. La mezcla se dejó reposar a baja temperatura durante toda la noche, formándose un precipitado que se filtró, se lavó con éter y se secó para dar 4,1 g de la 2-naftalenbencenosulfonamida de cefalosporina C.

29-1-75.



Picos de I.R. a 3450, 3060, 2925, 1770,
1730, 1660, 1530, 1385, 1230, 1160, 1075,
1035, 820, 750, 660 cm^{-1} .

Ejemplo 11

5 3,07 g de la sal de sodio de toluen-p-sul
fonamida de cefalosporina C que tenía una concentración
de 83,8% se pusieron en suspensión en 30 ml de cloruro
de metileno. Se añadieron luego 1,4 ml de trietilamina
y 1,9 ml de N,N-dimetilanilina y luego se añadieron con
10 agitación durante 5 minutos 2,4 ml de dimetildiclorosi-
lano. La agitación se mantuvo durante 1 hora a 28°C.
Luego se enfrió la solución a una temperatura de -60°C,
después de lo cual se añadió lentamente una solución de
3,13 g de PCl_5 en 30 ml de cloruro de metileno, seguido
15 de 2,5 ml de N,N-dimetilanilina. Después de 2 horas de
agitación a -40°C, se redujo la temperatura de nuevo
hasta -60°C y se añadieron 0,34 ml de N,N-dimetilanili-
na en 9 ml de metanol. Después de 2 horas a -40°C, se
añadieron 10 ml de agua a 90°C y la agitación se conti-
20 nuó durante 5 minutos a 4°C. Luego se recuperó la fase
acuosa y la fase orgánica se extrajo con 10 ml de agua
fría. Los extractos acuosos reunidos se lavaron con 10
ml de cloruro de metileno y el pH se ajustó a 3,6-3,7
por adición, con agitación, de una solución acuosa de
25 amoníaco concentrado. Después de dejar la mezcla reposar
29-1-75.



toda la noche a baja temperatura, el precipitado que se formó se filtró, se lavó con cloruro de metileno, agua, acetona y éter, dando 0,80 g (65%) de ácido 7-aminocefalosporánico con una concentración espectrofotométrica de 94,4%.

5

Ejemplo 12

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 11 pero empleando la sal de sodio de toluen-p-sulfonamida de cefalosporina C que tenía una concentración de 38,8%, se obtuvo 7-AAC que tenía una concentración de 90,7% con un rendimiento de 55,1%.

10

Ejemplo 13

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 11, a partir de la sal de sodio de p-isopropilbencenosulfonamida de cefalosporina C que tenía una concentración de 76%, se obtuvo 7-AAC que tenía una concentración de 94,1% con un rendimiento de 68%.

15

Ejemplo 14

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 11, se obtuvo 7-AAC que tenía una concentración de 91,4% con un rendimiento del 41,4% a partir de la sal de sodio de p-isopropilbencenosulfonamida de cefalosporina C que tenía una concentración de 43,8%.

20

- La presente solicitud que corresponde a

la presentada en Gran Bretaña, el 20 de Febrero de 1974,

25

29-1-75.



-7 FEB 1975

bajo el Nº 7699/74, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

REIVINDICACIONES

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:

5
10
15
1a.- Procedimiento para la recuperación de cefalosporina C de un medio acuoso, en donde dicho medio se trata con un cloruro de sulfonilo de fórmula $R-SO_2Cl$, en la cual R es un grupo alcoholo sustituido o no sustituido que tiene de 4 a 10 átomos de carbono, o un grupo arilo sustituido o no sustituido, para convertir la cefalosporina C en la sulfonamida correspondiente y se extrae la sulfonamida con un disolvente esencialmente inmiscible con el agua.

18
2a.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1a, en donde el medio acuoso es un caldo de fermentación que contiene cefalosporina C.

29-1-75.



-7 FEB 1975

3a.- Procedimiento de acuerdo con las rei
vindicaciones anteriores, en donde cuando R es un grupo
arilo sustituido, los sustituyentes del grupo R son uno
o más radicales elegidos de la clase que consiste en:
5 grupos alcohilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono,
grupos alcoxi que tienen de 1 a 6 átomos de carbono,
átomos de halógeno o grupos nitro.

4a.- Procedimiento de acuerdo con las rei
vindicaciones anteriores, en donde el cloruro de sulfo-
nilo es cloruro de toluen-p-sulfonilo.
10

5a.- Procedimiento de acuerdo con las rei
vindicaciones 1a a 3a, en donde el cloruro de sulfonilo
es cloruro de p-isopropilbencenosulfonilo.

6a.- Procedimiento de acuerdo con las rei
vindicaciones 1a a 3a, en donde el cloruro de sulfonilo
es cloruro de beta-naftalensulfonilo.
15

7a.- Procedimiento de acuerdo con las rei
vindicaciones anteriores, en donde la proporción molar
cloruro de sulfonilo/cefalosporina C presente en el me-
dio acuoso, es mayor que 1, preferiblemente comprendida
en el intervalo de 3 a 10.
20

8a.- Procedimiento de acuerdo con las rei
vindicaciones anteriores, en donde la temperatura de la
reacción de cloruro de sulfonilo con la cefalosporina C
está comprendida en el intervalo de 0 a 40°C, preferi-
25
29-1-75.



-7 FEB 1975

blemente de 10 a 20°C.

5 9a.- Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en donde como disolvente inmiscible con el agua se emplea un disolvente elegido del grupo que comprende acetato de etilo, n-butanol y metilisobutilcetona.

10 10a.- Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en donde el pH del medio de reacción se mantiene a un valor superior a 7, y preferiblemente en el intervalo de 7,5 a 9,5, por medio de un agente tampón.

15 11a.- Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en donde la extracción de la sulfonamida de cefalosporina C se lleva a cabo a un pH inferior a 7, preferiblemente a un pH de 1 a 4.

12a.- Procedimiento para la recuperación de cefalosporina C de un medio acuoso.

20 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

29-1-75.

pe



-7 FEB. 1975

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

Madrid,

-7 FEB. 1975

P. A.

Alberto de Eizaburu
Por Poder

29-1-75.

G.D.S.

- 30 -