

3435751
PATENTE DE INVENCION

Le A 15 577-Sp.

Int. Cl.: C07D 501/14 // A61K 31/545

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE DERIVADOS DE
7-AMINO- Δ^3 -CEFEM.-

Solicitante: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, entidad alemana, residen-
te en Leverkusen-Bayerwerk, República Federal
Alemana.-

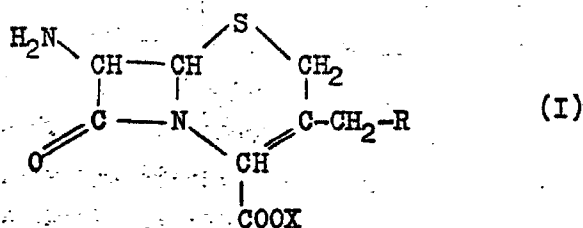
La presente invención se refiere a un nuevo
procedimiento para la obtención de derivados de 7-amino- Δ^3 -
cefem que se pueden emplear como productos intermedios para
la síntesis de sustancias activas antimicrobiales.

5.

Ya es conocido que el ácido 7-amino-cefaloesporá-

5. nico se obtiene, por ejemplo, por la disociación de cefaloesporina C con cultivos de distintos microorganismos (véase, por ejemplo, patente US 3.239.394) o por disociación química según diferentes métodos (véase, por ejemplo, la publicación alemana DAS 1.176.147, la publicación alemana DOS 1.145.615 o la patente US 3.272.809). La desacetoxi-cefaloesporina C se puede transformar, después de reducción catalítica (véase patente US 3.124.576), en forma análoga en el ácido 7-amino-desacetoxi-cefaloesporánico. Por la publicación alemana DOS 10. 2.212.276 se conoce también un procedimiento para la disociación enzimática de ácido 7-fenoxiacetamido-desacetoxi-cefaloesporánico a ácido 7-amino-desacetoxi-cefaloesporánico con ayuda de una enzima adsorbtivamente ligada de Bacillus megaterium B 400. Asimismo se han dado a conocer varios procedimientos para la disociación de penicilinas con ayuda de penicilinacilasas covalentemente ligadas a soportes hidrosolubles (véanse las publicaciones alemanas DOS 1.907.365, 1.917.057 y 2.215.687).

20. Se ha descubierto que se obtienen los derivados de 7-amino- Δ^3 -cefem de fórmula

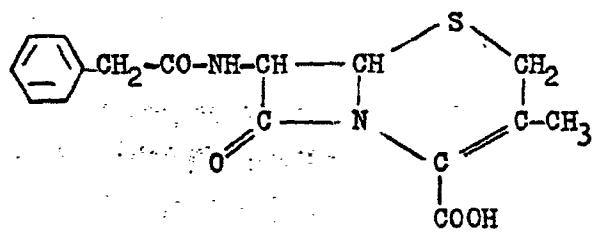


25. donde R significa hidrógeno; hidroxilo; amino; ciano; $-O-CO-NH_2$; $-S-C(=S)-N(CH_2)_n$, donde n representa un número entero de 4 a 6; $-O-CO-R^1$, $-NH-CO-R^1$, $-S-CS-O-R^1$, donde R^1 significa alquilo con 1 a 4 átomos de carbono; o donde R signi-

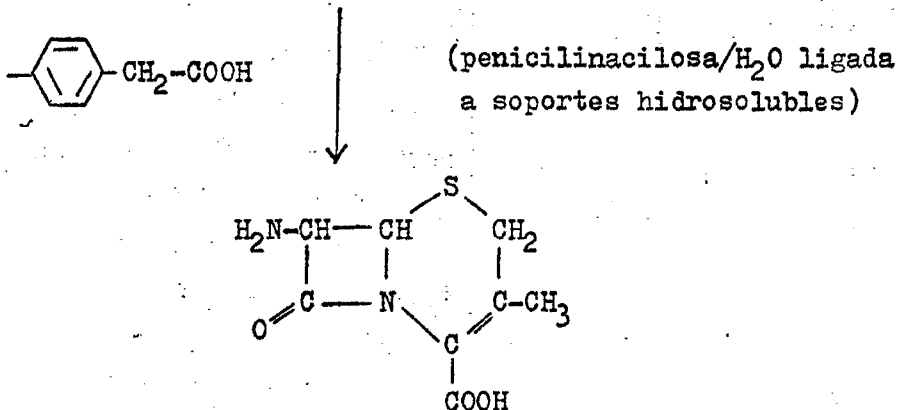
30.

trafiltración y ser empleada de nuevo. Además, en caso deseado, de los preparados enzimáticos se pueden obtener también preparados de penicilinacilasa hidrosolubles, si penicilinacilasa covalentemente ligada a soportes hidrosolubles se incluye en un material soporte insoluble en agua, por ejemplo, por encapsulación o inclusión en polímeros. Estos preparados insolubles en agua se pueden emplear en muchos casos en forma favorable. Según el presente procedimiento se obtienen los compuestos de fórmula I en muy buena pureza y elevados rendimientos con un gasto industrial muy reducido. En comparación con el empleo de una enzima solo adsorptivamente ligada (véase la publicación alemana DOS 2.212.276) tiene el empleo de la penicilinacilasa covalentemente ligada, hidrosoluble, la ventaja de que la enzima, también al emplear concentraciones más elevadas del sustrato cefaloesporina de fórmula II, se mantiene ligada, con lo que resulta una economía considerablemente incrementada en comparación con los demás procedimientos. El procedimiento de la presente invención representa por lo tanto un enriquecimiento de la técnica.

Empleando por ejemplo ácido 7-fenil-acetamido-desacetoxi-cefaloesporánico como producto de partida se puede representar el desarrollo de la reacción mediante el siguiente esquema de fórmulas:



5.
10.
15.
20.
25.
30.



5.

10.

Los compuestos a emplear como productos de partida están en general definidos por la fórmula II de arriba.

El alquilo R^1 significa alquilo de cadena recta o ramificada con 1 a 4, preferentemente 1 ó 2 átomos de carbono. Como ejemplos sean mencionados metilo, etilo, n- e i-propilo.

25.

n representa preferentemente 4 ó 5.

20.

El anillo Het heteroaromático de 5 ó de 6 miembros contiene preferentemente 1 a 3, especialmente 1 ó 2 heteroátomos iguales o diferentes. Como heteroátomos están oxígeno, azufre o nitrógeno. Como ejemplos sean mencionados furilo, tienilo, pirazolilo, imidazolilo, 1,2,3- y 1,2,4-triazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, 1,2,3-, 1,3,4-, 1,2,4- y 1,2,5-oxadiazolilo, azepinilo, pirrolilo, isopirrolilo, piridilo, piridinium, piridazinilo, pirimidinilo y pirazinilo.

25.

El anillo heteroaromático Het puede estar sustituido por 1 a 3, preferentemente 1 ó 2 grupos alquilo, preferentemente con 1 a 3 átomos de carbono, pudiendo ser mencionados como ejemplos, metilo y etilo.

30.

El alquilo en la definición de R_2 significa alquilo de cadena recta o ramificada con 1 a 4, especialmente 1 ó 2

átomos de carbono, tal como metilo, etilo y n- e i-propilo.

Como sales de los compuestos de fórmula II con bases inorgánicas u orgánicas, que se pueden emplear en el procedimiento de la presente invención, sean mencionadas las

5.

sales alcalinas, tales como las sales sódicas y potásicas, las sales alcalino-térreas, tales como las sales cálcicas, las sales amónicas, así como las sales que se forman con aminas alifáticas, aralifáticas o aromáticas. Como ejemplo sean mencionadas las alquilaminas primarias, secundarias y

10.

terciarias que contienen 1 a 4 átomos de carbono por cada grupo alquilo y en donde los grupos alquilo pueden estar sustituidos por grupos hidroxilo, por ejemplo, etilamina, trietilamina, hidroxietilamina; aminas cíclicas, por ejemplo, piridina, piperidina, morfolina, piperazina y N-metilpiperazina.

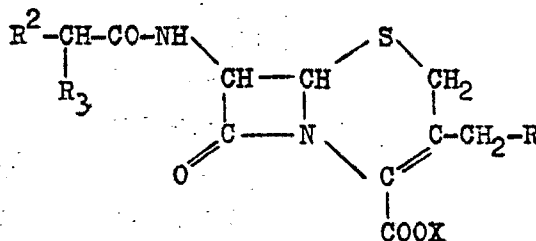
15.

Los compuestos de fórmula II a emplear según la presente invención ya son conocidos o se pueden obtener según procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, E.H. Flynn, Cephalosporins and Penicillins, Chemistry and Biology, Academic Press, New-York, 1972).

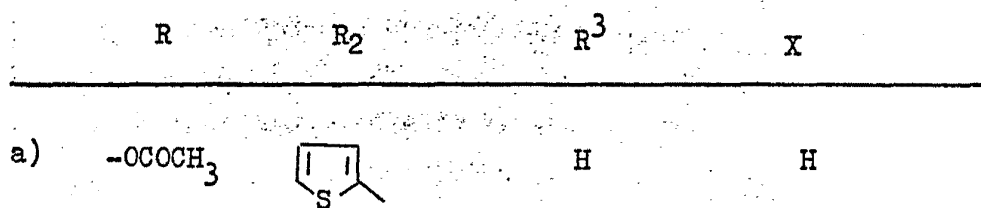
20.

Como ejemplos de compuestos de fórmula II (especialmente preferentes para el procedimiento de la presente invención) sean mencionados:

25.



5.



10.



15.



20.



25.



De estos compuestos son especialmente preferentes, para su empleo en el procedimiento de la presente invención, los compuestos d) a g).

5. La penicilinacilasa que está covalentemente ligada a soportes hidrosolubles puede ser de los más distintos orígenes.

10. La penicilinacilasa (Enzyme Commission 3.5.1.11) se puede obtener de numerosos microorganismos según métodos en general conocidos (véase por ejemplo, también las publicaciones alemanas DOS 1.907.365 y 2.217.745), por ejemplo, de bacterias, especialmente *Escherichia coli*, *Erwinia* o actinomicetos tales como *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia* u hongos tales como *Fusarium* y levaduras. Tiene especial preferencia la penicilinacilasa de *Escherichia coli*, por ejemplo, de una *Escherichia coli* depositada bajo ATCC 11 105. El aislamiento de la penicilinacilasa de *Escherichia coli* se efectúa, por ejemplo, según la publicación alemana DOS 2.217.745 ajustando un extracto en bruto de células de *Escherichia coli*, que además de la penicilinacilasa contiene fragmentos de células de *Escherichia coli*, a un valor pH de 3,5 a 5,5, preferentemente de 5,0 y centrifugando el extracto, a continuación tratando la solución clara de la penicilinacilasa obtenida como sobrenadante con silicatos de aluminio, preferentemente bentonita, separando el adsorbato en forma conocida y eluyendo, por ejemplo, con una solución 0,1 - 1,0 molar de acetato sódico o potásico a un pH de 8,5 aproximadamente.

25. La solución clara de penicilinacilasa enriquecida, así obtenida, se puede seguir purificando, si se desea, cromatográficamente en intercambiadores de iones macroporosos, por ejemplo, celulosa sulfoetífica.

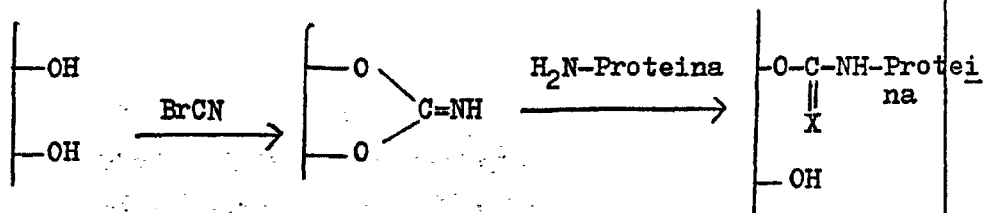
30.

Como soportes hidrosolubles, en los cuales se puede ligar covalentemente la penicilinacilasa, entran en consideración muchos compuestos polímeros hidrosolubles. Con preferencia se pueden emplear como soportes polímeros prácticamente todos los polisacáridos. Como ejemplos sean mencionados ante todo: dextrano, féculas solubles en agua, laevan, así como celulosa carboximetflica. Tienen especial preferencia el dextrano y la fécula. Como polisacáridos entran preferentemente en consideración aquellos con un peso molecular de unos 5000 a unos 1000.000, especialmente 10 000 a 800.000.

La obtención de la penicilinacilasa covalentemente ligada a soportes solubles en agua, utilizables según la presente invención, bajo el empleo de polisacáridos se puede realizar como sigue:

Al emplear polisacáridos como soportes polímeros hidrosolubles se hacen reaccionar estos polisacáridos primeramente con preferencia en un halocianuro. A continuación se hace reaccionar el compuesto intermedio activo, aquí formado, en caso dado después de su aislamiento, con penicilinacilasa (véase publicación alemana DOS 1.768.512, correspondiente a la patente US nº 3.645.852).

El desarrollo de esta reacción de dos etapas (formación de un compuesto intermedio activo y ligado de la penicilinacilasa al soporte polímero) se puede representar mediante el siguiente esquema de fórmulas:



donde X puede ser un grupo NH u oxígeno, —OH —OH re-

presenta una parte del soporte polímero (polisacárido) y H_2N -proteína significa la penicilinacilasa.

Como halocianuro entran en consideración iodo-, cloro- y bromocianuro, especialmente el bromocianuro.

5. Como diluyente o bien disolvente se emplea, tanto en la primera etapa (reacción de polisacárido con halogenocianuro), como también en la segunda etapa (reacción del compuesto intermedio con penicilinacilasa), preferentemente el agua.

10. Por gramo de polisacárido se emplean, al utilizar dextrano, preferentemente 5 a unos 250, especialmente 10 a 200 mg de halocianuro y, al emplear fécula, preferentemente 50 a unos 500, especialmente 80 a 200 mg de halocianuro.

15. La temperatura de reacción se encuentra en estas dos etapas entre unos 0 y unos 50°C, preferentemente entre 10 y 25°C. Las reacciones se pueden efectuar a presión normal pero también a presión más elevada, preferentemente a presión normal. En la obtención de los preparados de penicilinacilasa se mantiene el medio de reacción, mediante adición de una base, por ejemplo, de lejía sódica, en la zona Ph de 8 - 13, preferentemente en un pH de 11,0. La reacción de halocianuro con el polisacárido ha terminado en muchos casos después de 10 - 20 minutos. La solución del compuesto intermedio activo formado del polisacárido y del halocianuro no deberá contener para la reacción con la penicilinacilasa ningún halocianuro libre. La reacción debiera realizarse lo antes posible, ya que el derivado reactivo del polímero se inactiva fácilmente debido a hidrólisis. Antes de la reacción con la penicilinacilasa se ajusta el pH de la solución, que contiene el derivado polímero activo, preferentemente a 8,5
25. aproximadamente. Después de agregar la penicilinacilasa se agi-
- 30.

- ta a unos 0 hasta unos 50°C, preferentemente 5 a 10°C. El derivado enzimático de alto peso molecular se puede separar a continuación en la forma usual, por ejemplo, por ultrafiltración de la enzima nativa, sin reaccionar, con membranas que sean impermeables para los preparados de enzima-polímero. En el caso de emplear dextrano con un peso molecular de 500.000 se pueden emplear por ejemplo, membranas que sean impermeables a las sustancias con un peso molecular superior a 100.000.
- 5.
10. La proporción entre polisacárido, halocianuro y penicilinacilasa se puede variar entre amplios límites. Con seguridad se logra una reacción total de la enzima si por parte en peso de proteína enzimática se emplean como mínimo 5 partes en peso de polisacárido.
15. Se ha demostrado que la proporción cuantitativa entre halocianuro y polisacárido puede influenciar considerablemente la duración del derivado enzimático. Así, la penicilinacilasa nativa en solución acuosa a un pH de 7,8 y 45°C se inactiva hasta en un 95 % en el plazo de 24 horas. Bajo iguales condiciones pierde la penicilinacilasa ligada a soporte, hidrosoluble, que por ejemplo se copuló con dextrano del peso molecular 500.000, en 24 horas solo un 47 % de actividad si por gramo de dextrano se emplean 17 mg de bromocianuro. Sin embargo, si por gramo de dextrano se emplean 80
20. mg de bromociano se reduce la actividad enzimática en 24 horas solo en un 5 %. Aquí sorprende que, con igual rendimiento de copulación, por aumento de la proporción de halocianuro se pueda aumentar considerablemente la estabilidad de la penicilinacilasa ligada a soporte, hidrosoluble. Posiblemente
25. se forman, por el aumento de la cantidad de halocianuro
- 30.

entre la molécula soporte y la molécula de enzima, más enlaces covalentes. De esta manera se podría estabilizar la estructura terciaria de la enzima más, contra más enlaces covalentes se hayan formado entre el soporte y la enzima. El

5. empleo cuantitativo de halocianuro está sin embargo limitado, ya que debido a reticulaciones transversales se pueden formar derivados enzimáticos de difícil solubilidad y/o insolubles. Así, no es recomendable emplear, al utilizar polisacáridos, por ejemplo, dextrano con un peso molecular de aproximadamente 500.000 por gramo, más de 150 mg de halocianuro, por ejemplo, bromocianuro.

10. Si, por el contrario se emplea un polisacárido por ejemplo, dextrano, con un peso molecular inferior, por ejemplo, de 20.000, entonces se puede, sin más, dejar reaccionar por gramo de polisacárido más de 300 mg de halocianuro, por ejemplo, bromocianuro. Sin embargo, al emplear soportes con pesos moleculares más bajos se reduce la estabilidad de la enzima.

15. También con fécula como soporte hidrosoluble se pueden obtener derivados extraordinariamente estables de las penicilinacilasas. La estabilidad del derivado enzimático depende, también aquí, asimismo del empleo del halocianuro. Preferentemente se hacen reaccionar por gramo de fécula como mínimo 150 mg de halocianuro, por ejemplo, bromocianuro.

20. Los pesos moleculares, en cada caso más favorables, de los soportes y clase y cantidad de las halocianuros, así como de la penicilinacilasa se pueden determinar fácilmente por cualquier especialista.

25. Para la realización del procedimiento de la presente invención (transformación de los compuestos de fórmula II

30.

5. en compuestos de fórmula I) se puede emplear directamente la penicilinacilasa que está ligada covalentemente a soportes hidrosolubles, esto es, sin ulterior modificación o, sin embargo, también encerrada en un material soporte insoluble en agua, por ejemplo, cápsulas, polímeros de las más distintas clases, o preferentemente hilado en fibras (véase la publicación alemana DOS 3.715.277). La inclusión de la enzima ligada covalentemente con soportes solubles en agua se puede realizar aquí, contrario a la enzima libre, no covalentemente ligada, sin pérdidas de actividad apreciables.

10. La penicilinacilasa ligada covalentemente a soportes solubles en agua se puede hilar a fibras, como ya se ha mencionado, según el método de la publicación alemana DOS 1.932.426, correspondiente a la patente US 3.715.277. El preparado enzimático se dispersa por ejemplo, para ello con ayuda de un emulsionante y se hila por el procedimiento de hilado en húmedo o por el procedimiento de hilado en seco en polímeros a estructuras fibrosas. Como polímeros entran aquí en consideración los polímeros y copolímeros de las clases más distintas, tales como derivados de celulosa, especialmente triacetato de celulosa.

15. Una penicilinacilasa ligada a dextrano del peso molecular 500.000 se puede copolimerizar, por ejemplo, en rendimientos de un 60 % de la actividad enzimática original según los procedimientos conocidos por la literatura (H.Nilson, R. Mosbach, Biochim. Biophys. Acta 268 (1972), 253-256). Aquí se puede copolimerizar en la forma usual la penicilinacilasa covalentemente ligada a un soporte soluble en agua por ejemplo en un copolímero compuesto de acrilamida, N,N'-metileno-bisacrilamida y N,N,N',N'-tetrametiletildiamina. En el ensayo

20.

25.

30.

de control con penicilinacilasa nativa, esto es, no ligada covalentemente a un soporte, se obtuvieron después de copolimerizar bajo iguales condiciones de ensayo solo un 10 % de la actividad enzimática originalmente existente. La enzima ligada a soporte copolimerizada demostró ser extraordinariamente estable, también después de repetidos empleos para la obtención de los compuestos del tipo I. El derivado de enzimas copolimerizado permite una separación más rápida y sencilla del medio de reacción ya que el polímero se puede preparar en granulometrías de más de 1 mm de diámetro. Las nuevas sustancias muestran un fuerte efecto enzimático, por lo que son en alto grado adecuadas.

Generalmente se realizan las disociaciones enzimáticas para la obtención de los compuestos de fórmula I con ayuda de la penicilinacilasa ligada covalentemente a un soporte soluble en agua, en soluciones diluidas que preferentemente contienen desde un 1 a un 20, especialmente de un 3 a 6 % (en peso) de los compuestos de fórmula II. Antes del aislamiento de los productos finales es conveniente evaporar aproximadamente un 50% o más del agua empleada como diluyente. Como la penicilinacilasa ligada a soporte, empleada según la presente invención, permite también disociaciones con mayores concentraciones de sustrato, se ha de evaporar menos agua correspondiendo al mayor empleo de producto de partida. El empleo según la presente invención de los derivados hidrosolubles de la penicilinacilasa para la obtención de los compuestos de fórmula I es por lo tanto muy económico siendo de poca importancia con respecto a la nueva utilización del derivado enzimático y al rendimiento en compuestos de fórmula I, si el derivado enzimático hidrosoluble se emplea directamente

en solución acuosa o en la forma insoluble después de polimerización o inclusión en polímeros.

5. En la realización del procedimiento de la presente invención se disuelve o suspende el compuesto de fórmula II a disociar preferentemente en agua o en una mezcla de agua y hasta aproximadamente un 10 % (en volumen) de un disolvente orgánico, preferentemente de un disolvente orgánico polar miscible con agua, preferentemente alcoholes alquílicos inferiores, tales como metanol y etanol, cetonas alquílicas, tales como acetona o formamidas dialquílicas inferiores, tales como dimetilformamida.

10. Preferentemente se emplean 1 a 20, especialmente 3 a 6 partes en peso del compuesto de fórmula II.

15. La solución y/o suspensión se pone en forma arbitraria en contacto con el derivado enzimático hidrosoluble, Por ejemplo, el derivado enzimático se puede disolver en agua, o, después de su inclusión en un polímero, estar suspendido en la solución.

20. La reacción (disociación de los compuestos de fórmula II a compuestos de fórmula I) se efectúa a unos 20 hasta unos 45°C, preferentemente a 35 a 40°C.

25. Para la neutralización del resto acílico, que se disocia durante la reacción, es conveniente una vigilancia continua y graduación del pH. El pH se deberá mantener durante la reacción preferentemente en un valor de pH 6 a 9, especialmente pH 7,5 a 8,5. Esto se puede realizar, si es necesario, mediante adición de una base a la mezcla de reacción. Como bases entran para ello en consideración prácticamente todas las bases inorgánicas y orgánicas, tales como fosfato
30. terc.sódico, hidróxidos alcalinos, carbonatos alcalinos e hi-

5. drogenocarbonatos, carbonatos alcalino-térreos e hidróxidos alcalino-térreos, amoniaco, aminas primarias, secundarias y terciarias, alifáticas y aromáticas, así como bases heterocíclicas. Como ejemplos sean mencionadas hidróxido sódico y potásico, carbonato sódico y potásico, hidrogenocarbonato sódico y potásico, etilamina, metiletilamina, trietilamina, mono-, di- y tri-hidroxi-etilamina, anilina, piridina y piperidina. Del consumo de la base se aprecian fácilmente la velocidad de reacción, así como la terminación de la reacción.
10. La velocidad de reacción depende ante todo de la proporción entre la cantidad de derivado de penicilinacilasa disponible y la cantidad del compuesto de fórmula II empleado y de la actividad específica de la penicilinacilasa covalentemente ligada empleada.
15. La actividad específica de la penicilinacilasa se indica en unidades/cc de solución o unidades/g de peso húmedo. 1 unidad se define como la actividad de penicilinacilasa que en un minuto hidroliza un micromol de penicilina G, a 37°C y un pH 7,8, a ácido 6-aminopenicilánico y ácido fenilacético.
20. Para la disociación completa de 1 kg de ácido 7-fenilacetamido-desacetoxi-cefaloesporánico en el plazo de 2 horas se necesitan por ejemplo, unas 120.000 unidades de penicilinacilasa ligada a soporte, soluble en agua. Con tiempos de disociación más largos se precisa correspondientemente menos penicilinacilasa. Las proporciones cuantitativas y tiempos de reacción más favorables se pueden determinar fácilmente por el especialista.
25. Terminada la reacción de disociación se separa el derivado de penicilinacilasa hidrosoluble por ultrafiltración
- 30.

5. y se puede emplear inmediatamente para ulteriores preparados de disociación. Si el derivado enzimático, covalentemente ligado, hidrosoluble, se encapsuló, copolimerizó o se hiló, según la publicación alemana DOS 1.932.426 correspondiente a la patente US 3.715.277, en filamentos, entonces se puede separar en forma especialmente sencilla por filtración, decantación o centrifugación.

10. Para la ultrafiltración se emplean con especial ventaja los módulos usuales en el mercado con membranas que son impermeables para moléculas con pesos moleculares de más de 20.000 hasta unos 100.000 aproximadamente.

15. De la solución clara liberada de los correspondientes preparados de penicilinacilasa se aísla el compuesto de fórmula I formado según procedimientos en general usuales. Procedimientos usuales son, por ejemplo, la precipitación con ácidos minerales inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácidos carboxílicos orgánicos, por ejemplo, ácidos alquilcarboxílicos inferiores, tales como ácido acético en el punto isoeléctrico
20. o también mediante los procedimientos cromatográficos usuales, tales como cromatografía de capa delgada o de columna.

25. En muchos casos es también ventajoso retirar por extracción, antes de la precipitación del compuesto de fórmula I formado, el resto acílico disociado bajo un pH débilmente ácido con un disolvente orgánico no miscible con agua, tal como acetato de etilo, metilisobutilcetona o iso-butilacetato. La extracción se efectúa preferentemente por debajo de un pH de 6,0. Como, sin embargo, con valores de pH bajos disminuye la solubilidad de los compuestos de fórmula I en
30. agua, se ha de diluir eventualmente con agua antes de acidifi-

car. Además también puede ser ventajoso, para lograr buenos rendimientos, concentrar las soluciones acuosas en vacío antes de precipitar el producto.

5. El producto precipitado, o bien obtenido por cromatografía, se puede purificar según métodos usuales. Por ejemplo, para la eliminación total del resto disociado se puede lavar con un disolvente adecuado, por ejemplo, acetato de butilo o acetona y secar en vacío, obteniéndose directamente el compuesto de fórmula I puro.

10. Los compuestos de fórmula I obtenibles según la presente invención se pueden transformar según métodos en general conocidos, por ejemplo, por acilización en el grupo 7-amino, en valiosas sustancias activas antimicrobiales (véase, por ejemplo, E.H.Flynn Cephalosporins and Penicillins, Chemistry and Biology, Academic Press, New York 1972).

15. Los preparados de penicilinacilasa empleados en el procedimiento de la presente invención se pueden emplear varias veces debido a su gran estabilidad durante un largo periodo de tiempo, por lo cual su empleo es en especial grado económicamente ventajoso.

20. El procedimiento de la presente invención se explica a base de los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

25. a) 5 g de dextrano 500 con un peso molecular de 500.000 se disuelven en 165 cc de agua y con lejía sódica 2-n se ajusta a un pH de 11,0. A una temperatura de 20°C se agregan, bajo agitación, 85 mg de bromocianuro y el pH de la solución se mantiene con NaOH 2-n en 11,0. 10 minutos después de agregar el bromocianuro se ajusta la solución con ácido clorhídrico 2-n a un pH de 8,5 y se mezcla con 170 cc de una solución

30.

- acuosa de 550 mg de penicilinacilasa (actividad enzimática 7,3 U/mg). La solución se agita durante 16 horas en el refrigerador a 4°C. Después de la ultrafiltración no se puede demostrar en el filtrado ninguna actividad enzimática. La copulación con el soporte se desarrolla por lo tanto en forma completa. El rendimiento en actividad enzimática asciende a un 98 %, referido a la actividad inicial. Después de secado por congelación se mantiene totalmente la actividad enzimática.
- 5.
10. b) 5 g de dextrano 500, con un peso molecular aproximado de 500.000, se disuelven en 165 cc de agua y con lejía sódica 2-n se ajusta a un pH de 11,0. A una temperatura de 20°C se agregan bajo agitación 400 mg de bromocianuro y el pH de la solución se mantiene con lejía sódica en un pH de 11,0. 20 minutos después de agregar el bromocianuro se ajusta la solución con ácido clorhídrico 2-n a un pH de 8,5 y se mezcla con 170 cc de una solución acuosa de 550 mg de penicilinacilasa (actividad enzimática 7,3 U/mg). La solución se agita durante 16 horas en el refrigerador a 5°C. La enzima se liga bajo estas condiciones totalmente con el soporte. El rendimiento en actividad enzimática asciende a un 96 % referido a la actividad inicial.
- 15.
- 20.

Ejemplo 2

25. a) 5 g de dextrano 20, con un peso molecular aproximado de 20.000, se hacen reaccionar como indicado en el ejemplo 1 b) con 400 mg de bromocianuro y después con 550 mg de penicilinacilasa. El rendimiento en actividad enzimática asciende, después de la reacción, a un 96 % referido a la actividad inicial.
30. b) 5 g de dextrano 20 se hacen reaccionar como indica-

do en el ejemplo 1 b) con 800 mg de bromocianuro y después con 550 mg de penicilinacilasa. El rendimiento en actividad enzimática asciende, después de la reacción, a un 87 %, referido a la actividad inicial.

5. c) 5 g de dextrano 60 con un peso molecular aproximado de 60.000 se hacen reaccionar como indicado en el ejemplo 1 b) con 400 mg de bromocianuro y después con 550 mg de penicilinacilasa. El rendimiento en actividad enzimática asciende después de la reacción a un 99 %, referido a la actividad inicial.
- 10.

Ejemplo 3

- a) 5 g de fécula soluble según Zulkowsky (por ejemplo, el preparado comercial de la firma E. Merck/Darmstadt) se disuelven en 165 cc de agua y con lejía sódica 2-n se ajusta a un pH de 11,0. A una temperatura de 20°C se agregan bajo agitación 400 mg de bromocianuro y el pH de la solución se mantiene con NaOH 2-n en 11,0. 20 minutos después de agregar el bromocianuro se ajusta la solución con ácido clorhídrico 2-n a un pH de 8,5 y se mezcla con 170 cc de una solución acuosa de 550 mg de penicilinasa (actividad enzimática 7,3 U/mg). La mezcla se agita durante 16 horas en el refrigerador a 4°C. Después de la reacción asciende el rendimiento en actividad enzimática a un 98 %, referido a la actividad inicial. La penicilinacilasa covalentemente enlazada con la fécula se puede secar por congelación sin pérdida de actividad. El rendimiento es de 6,2 g con una actividad enzimática de 0,65 U/mg.
- 15.
- 20.
- 25.

- b) 103 g de fécula soluble según Zulkowsky (por ejemplo, el preparado industrial de la firma E. Merck/Darmstadt) se disuelven en 1250 cc de agua y con lejía sódica 2-n se
- 30.

- ajusta a un pH de 11,0. A una temperatura de 20°C se agregan bajo agitación 16,8 g de bromocianuro y el pH de la solución se mantiene con NaOH 2-n en 11,0. 20 minutos después de agregar el bromocianuro se ajusta la solución con ácido clorhídrico 2-n a un pH de 8,5 y se mezcla con 2060 cc de una solución acuosa de 10,3 g de penicilinacilasa (actividad enzimática 11,9 U/mg). La solución se agita en el refrigerador durante 16 horas a 4°C. Después de la reacción asciende toda la actividad enzimática a un 94,5 % referido a la actividad inicial.

Ejemplo 4

- 2,9 g de penicilinacilasa covalentemente ligada a fécula con una actividad de 650 U/g, obtenida según el ejemplo 3a) se disuelven en 600 cc de tampón 0,05-m de trietanolamina-ácido clorhídrico de un pH de 7,0. A la solución se le agregan 85,5 g de acrilamida, 4,5 g de N,N'-metilen-bisacrilamida y 5 cc de una solución acuosa de 2,5 g de peroxodisulfato amónico (solución A).

- En un matraz de tres cuellos, provisto de agitador, se introducen 2900 cc de tolueno, 1100 cc de cloroformo, 5 cc de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina y 10 cc de un emulsionante, se enfría a 4°C y se agita a una velocidad de 250 r.p.m. Bajo gas protector de nitrógeno se gotea, a través de un embudo goteador, la solución A en el recipiente de reacción, se agita durante 30 minutos y el polímero se separa por succión. Se lava ulteriormente dos veces consecutivas con 1 litro de tolueno y 2 litros de solución 0,5-m de cloruro sódico. En el polímero está contenida un 63 % de la actividad inicial de la penicilinacilasa.

30.

Ejemplo 5

Disociación de los compuestos de fórmula II:

5. 20 mmoles de los compuestos de fórmula II a disociar se disuelven en 200 cc de agua (en caso dado mediante adición de lejía sódica) a un pH de 7,5. A la solución agitada en un recipiente termoestabilizado a 37°C se agregan 150 cc de la solución obtenida según el ejemplo 1b) con una actividad total de 1500 U de penicilinacilasa ligada a dextrano.

10. Durante la reacción se mantiene el pH constante en 7,8 mediante adición de 0,5 m de NaOH a través de un graduador del pH. La terminación de la adición de NaOH indica la terminación de la reacción. Terminada la reacción se filtra la solución a través de un ultrafiltro hasta un volumen residual de 30 cc. A la solución residual se le agregan 100 cc de agua,

15. se filtra de nuevo hasta 30 cc, se repite de nuevo este proceso de lavado y los permeatos reunidos se concentran por evaporación en vacío a 30°C a 100 cc. La solución concentrada se mezcla con 50 cc de acetato de butilo y la solución obtenida de fórmula I se precipita mediante adición de ácido

20. clorhídrico 5-n hasta el punto isoeléctrico de 3,7. Después de dejar reposar la muestra durante 2-3 horas en el refrigerador se separa por filtración, el producto cristalino se lava en cada caso con 100 cc de agua y acetona y se seca en vacío.

25. La determinación del contenido de los productos se efectuó por determinación fotométrica del grupo 7-amino liberado en forma conocida, después de la reacción con p-dimetilaminobenzaldehído, en una modificación del método según Svotek (Czech. Patent 116 959 (1965)).

30. La extinción a 415 nm se comparó con las curvas standard para el ácido 7-aminocefaloespóránico puro y el áci-

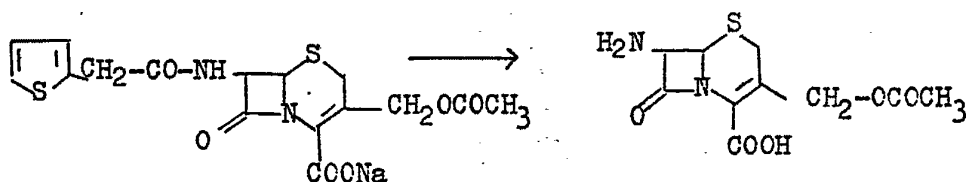
do 7-amino-desacetoxi-cefaloesporánico.

Además se demostró la identidad de los productos por espectros de infrarrojo y 1H-resonancia nuclear y por cromatografía de papel en el sistema butanol;ácido acético glacial:agua (12:3:5). De esta manera se realizaron las siguientes reacciones:

5.

Ejemplo 5 a)

10.



Compuesto de partida:

15.

9,08 g de ácido 7-(2-tienil)-acetamido-cefaloesporánico (sal sódica).

Duración de la reacción: 85 minutos

Producto fijal: ácido 7-aminocefaloesporánico

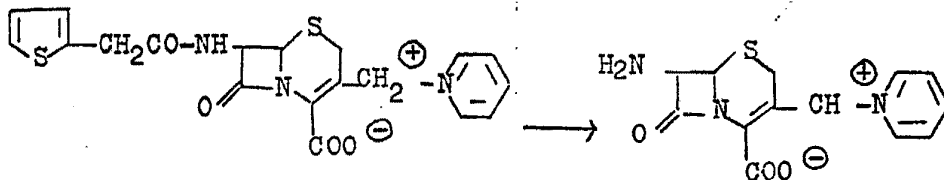
Rendimiento: 5,30 g (90 % de la teoría), pureza: 97 %

20.

Ref: 0,27 (ningún ácido desacetil-7-aminocefaloesporánico con Rf 0,10).

Ejemplo 5 b)

25.



Producto de partida:

8,70 g de 7-(2-tienil)-acetamido-3-pirimidiniummetil- Δ^3 -cefem-4-carboxilato

30.

Producto final: 7-amino-3-piridiniummetil- Δ^3 -cefem-4-carbo-

xilato

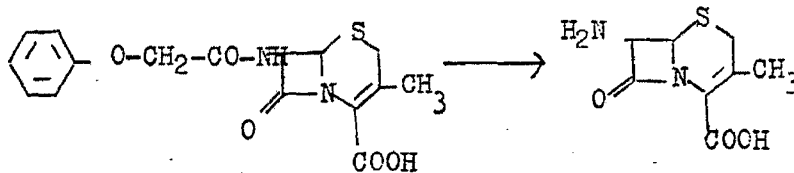
Duración de la reacción: 75 minutos

Rf: 0,05.

5. Debido al anillo piridínico en la molécula, el producto de esta reacción no se puede aislar por precipitación en el punto isoeléctrico. La terminación de la reacción y la identidad del producto se demostraron por cromatografía de papel.

Ejemplo 5 c)

10.



15.

Producto de partida:

7,01 g de ácido 7-fenoxiacetamido-desacetoxi-cefaloesporánico

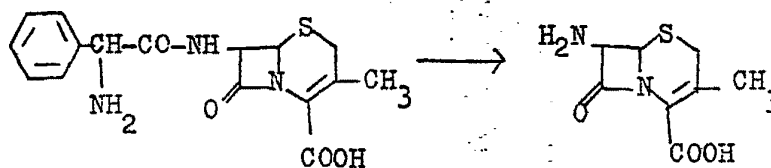
Producto final: ácido 7-amino-desacetoxicefaloesporánico

Rendimiento: 3,38 g (78 % de la teoría), pureza: 97 %

P.f. 238 - 240°C (descomposición)

20.

Ejemplo 5 d)



25.

Compuesto de partida:

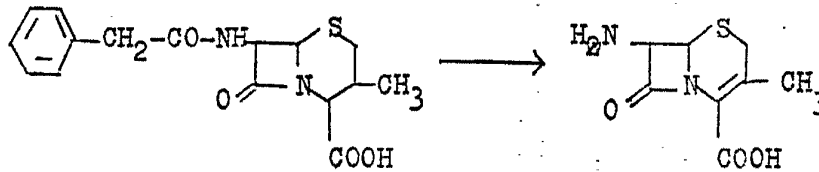
6,99 g de ácido 7-(-amino-fenilacetil)-desacetoxicefaloesporánico

Producto final: ácido 7-amino-desacetoxicefaloesporánico

30.

Rendimiento: 3,66 g (84 % de la teoría), pureza: 97 %.

Ejemplo 6



5.

10.

15.

20.

25.

30.

500 g de ácido fenilacetamido-desacetoxicefaloesporánico (pureza 98 %) se agregan a 20 litros de una solución de penicilinacilasa ligada a fécula que contiene una actividad total de 115.000 U. El preparado de reacción se mantiene, bajo agitación mediante adición de trietilamina, constante en un pH de $7,8 \pm 0,2$. La temperatura de reacción debe ascender a 38°C . Después de 65 minutos ya no se recoge mas trietilamina. La solución se filtra a través de un filtro de papel y se ultrafiltra en un módulo de laboratorio empleando 10 membranas que son permeables para moléculas hasta un peso molecular de 20.000 bajo una presión de servicio de 12 kg/cm^2 hasta un volumen residual de 1000 cc. El retentado, que además de la penicilinacilasa ligada con fécula separada, entre otros, contiene ácido 7-aminodesacetoxicefaloesporánico residual, se diluye 3 veces consecutivas, en cada caso con 1000 cc de agua y en cada caso se vuelve a ultrafiltrar a un volumen residual de 1000 cc. De los ultrafiltrados reunidos se aísla el ácido 7-aminodesacetoxicefaloesporánico formado, según procedimientos en general usuales, por ejemplo, los siguientes:

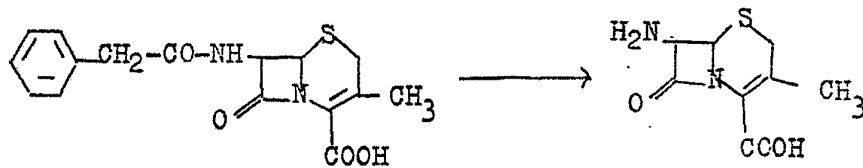
El ultrafiltrado, incluyendo el agua de lavado, se ajusta con ácido clorhídrico 5-n a un pH de 5,5 y se extrae dos veces, cada una con 5 litros de acetato i-butílico. La fase acuosa se ajusta a un pH de 7,0 y en vacío se concentra

5. por evaporación a 30°C hasta 8 litros. Del concentrado se precipita por adición de ácido clorhídrico 5-n el ácido 7-aminocefaloespóránico en el punto isoeléctrico en un pH de 3,7. Después de reposar durante 2 - 3 horas se controla el producto según el pH y en caso dado se ajusta a un pH de 3,7, se separa por succión y se lava ulteriormente en cada caso con 1000 cc de agua y acetona. Se seca en vacío a 40°C. Rendimiento 306 g (94 % de la teoría) pureza 97 %.

10. En igual forma se empleó la misma penicilinacilasa ligada a fécula 25 veces consecutivas sin que se presentara ninguna pérdida de actividad apreciable. El rendimiento de las 25 disociaciones ascendió en promedio a un 93,5 % de la teoría.

Ejemplo 7

15.



20.

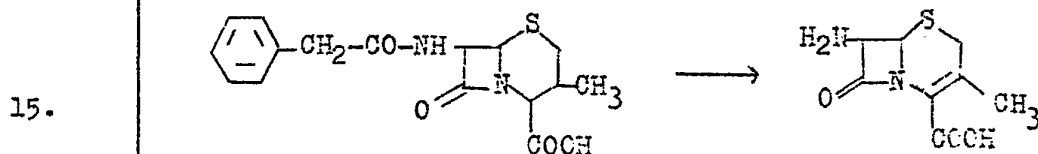
20 g (60 mmoles) de ácido 7-fenilacètamido-desacetoxicefaloespóránico se suspenden en 500 cc de agua y mediante adición de trietilamina se disuelve hasta un pH de 7,8. Se calienta a 37°C y se agregan 80 cc de la solución enzimática obtenida según el ejemplo 1 b) con una actividad total de 800 U. Mediante adición de trietilamina se mantiene el pH durante la disociación en 7,8 ± 0,3. Después de 6 horas ha terminado la reacción. La mezcla de reacción se filtra a través de un ultrafiltro hasta un volumen residual de 50 cc, la solución restante se diluye con 100 cc de agua y nuevamente se concentra por ultrafiltración a 50 cc. Este proceso

30.

de lavado se repite aún una vez más. Todos los permeatos se reúnen y en vacío se concentran por evaporación a 30°C a 400 cc.

5. Después de agregar 200 cc de metilisobutilcetona se ajusta con ácido clorhídrico 12-n a un pH de 3,7 y el ácido 7-aminodesacetoxi-cefaloesporánico cristalizado se separa por succión después de reposar durante 1 hora y se lava con poca agua y con poca agua/metilisobutilcetona y acetona. Rendimiento: 11,9 g (92,5 % de la teoría); pureza: 98 %.
10. Punto de fusión: 238 - 240°C (descomp.)

Ejemplo 8



20. 20 g (60 mmoles) de ácido 7-fenilacetamido-desacetoxicefaloesporánico se suspenden en 350 cc de agua y mediante adición de trietilamina se disuelve hasta un pH de 7,8. Se calienta a 37°C y se agrega la penicilinacilasa covalentemente ligada a fécula copolimerizada con una actividad total de 1120 unidades. Mediante adición de trietilamina se mantiene la mezcla de reacción durante la disociación en
25. un pH de $7,8 \pm 0,3$. Después de 5 horas ha terminado la reacción. El derivado de penicilinacilasa copolimerizado se separa por filtración y se lava con poca agua. Al filtrado, inclusive el agua de lavado, se le agregan 200 cc de metilisobutilcetona y ácido clorhídrico 12-n hasta un pH de 3,7. Después
30. de reposar durante 1 hora a 5° se reajusta el pH, en caso dado

con ácido clorhídrico, a 3,7 el ácido 7-aminodesacetoxicefalo-
loesporánico cristalizado se separa por succión y se lava
ulteriormente con poca agua y acetona.

Rendimiento: 12,1 g (94 % de la teoría). Pureza: 97,5 %.

5. Punto fusión: 238 - 240°C (descomp.)

Ejemplo 9

Obtención de las penicilinacilasas necesarias para
la obtención de los derivados enzimáticos:

10. a) Un extracto en bruto que contiene penicilinacilasa
se obtiene cultivando Escherichia coli según el procedimiento
descrito en la patente alemana 1.111.778, el cultivo se con-
centra por centrifugación a un lodo y las células se desdo-
blan según procedimientos mecánicos, en caso dado, bajo adi-
ción de un 3% de metilisobutilcetona.

15. b) 610 litros de un extracto en bruto así obtenido,
conteniendo $5,2 \cdot 10^6$ unidades se diluyen con agua desioniza-
da a 2100 litros, se ajusta con ácido sulfúrico a un pH de
5,0 y se centrifuga. En el sobrenadante claro se encuentran
 $5,7 \cdot 10^6$ unidades con una actividad específica de 1,7 U/mg.

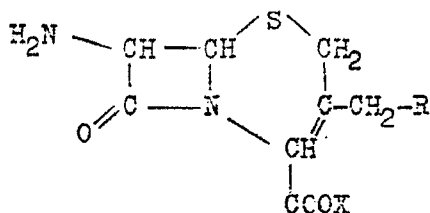
20. Reajustando el pH a 5,0 se introducen y agitan
13,8 kg de bentonita y después de 30 minutos se separa a
través de una centrifugadora de paso. La bentonita separada
por centrifugación se eluye con 90 litros de solución 0,5-m
de acetato sódico pH 8,0 y se separa por filtración. Se obtie-
25. nen 92,5 litros conteniendo $4,5 \cdot 10^6$ unidades (86 % de la teo-
ría) con una actividad específica de la penicilinacilasa de
6,5 U/mg.

N O T A

30. Descrita suficientemente la naturaleza del invento,
así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacer-

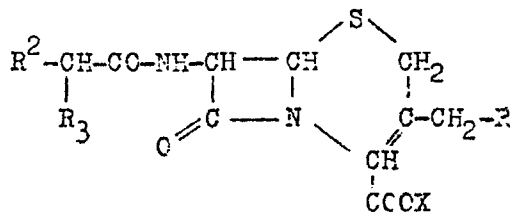
se constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente, presentada en Alemania, con fecha 28 de febrero de 1974, bajo el número P 24 09 569.0; acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales 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 LA OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE 7-AMINO- Δ^3 -CEFEM; caracterizándose por lo siguiente:

1.- Procedimiento para la obtención de derivados de 7-amino- Δ^3 -cefem de fórmula



donde R significa hidrógeno; hidroxilo; amino; ciano;

$\text{C}-\text{CO}-\text{NH}_2$; $-\text{S}-\underset{\text{S}}{\text{C}}-\text{N}(\text{CH}_2)_n$, donde n representa un número entero de 4 a 6; $-\text{C}-\text{CO}-\text{R}^1$, $-\text{NH}-\text{CO}-\text{R}^1$, $-\text{S}-\text{CS}-\text{C}-\text{R}^1$, donde R^1 significa alquilo con 1 a 4 átomos de carbono; o donde R significa $-\text{S}-\text{Het}$ ó Het , donde Het significa un resto heteroaromático de 5 ó de 6 miembros, que en caso dado puede llevar una carga positiva; y X significa hidrógeno o el símbolo de una carga negativa en caso de que el resto R contenga una carga positiva, caracterizado porque compuestos de fórmula



donde R y X tienen el significado arriba indicado y R² significa un anillo fenilo, fenoxi, 2-tienilo o 2-furilo, en caso dado sustituido en el anillo por amino, hidróxi o alquilo con 1 a 3 átomos de carbono y R³ significa hidrógeno, amino, hidróxi o alquilo con 1 a 3 átomos de carbono, o sus sales con bases inorgánicas u orgánicas, se ponen en contacto con penicilinacilasa que está ligada covalentemente a soporte solubles en agua, en caso dado en una forma encerrada en un material soporte insoluble en agua, y el derivado de 7-amino- Δ^3 -defem de fórmula I se aísla.

5.

10.

2.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque R, R³ y X significan hidrógeno y R² significa fenilo.

15.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque R, R³ y X significan hidrógeno y R² significa fenoxi.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque R significa -O-COCH₃, R³ significa fenoxi y R³ y X significan hidrógeno.

20.

5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque R significa -O-CO-CH₃, R² significa fenilo y R³ y X significan hidrógeno.

25.

6.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la penicilinacilasa está covalentemente ligada a un polisacárido.

7.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la penicilinacilasa está covalentemente ligada a fécula.

30.

8.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la penicilinacilasa está covalente li-

gada a dextrano.

5.

9.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la penicilinacilasa ligada covalentemente a un soporte soluble en agua está ocluida en un material soporte insoluble en agua.

10.- Procedimiento para la obtención de derivados de 7-amino- Δ^3 -cefem, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

10.

Esta Memoria consta de 31 hojas escritas a máquina por una sola cara.

27 FEB. 1975

Madrid,

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.-

J. GOMEZ ACEBO Y HUDET
p. Firmado: L. García Fernández

