

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA  
Registro de la Propiedad Industrial

Concedido el Registro de acuerdo  
con los datos que figuran en la pre-  
sente descripción y según el con-  
tenido de la Memoria adjunta.



ESPAÑA

PATENTE DE INVENCION

484.144

(11) NUMERO	(10) AI
(21) 484.144	
(22) FECHA DE PRESENTACION	
13-9-1979	

484.144

(12) PRIORIDADES: (31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
113096/73	14-9-1978	Japón
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07D 501/12	
(64) TITULO DE LA INVENCION		
"UN METODO PARA SEPARAR ENTRE SI DESACETIL-CEFALOSPORINA C, DESACETOXI-CEFALOSPORINA C Y CEFALOSPORINA C"		
(71) SOLICITANTE (S)		
TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. (Case F-2405)		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
27, Doshomachi 2-chome, Higashi-ku, Osaka, 541, Japón		
(72) INVENTOR (ES)		
KIYOSHI NARA, KAZUYOSHI KATAMOTO y KAZUHIKO OHTA		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE		
DON ALBERTO DE ELIZABURU MARQUEZ (P.-72.867)		

JGA

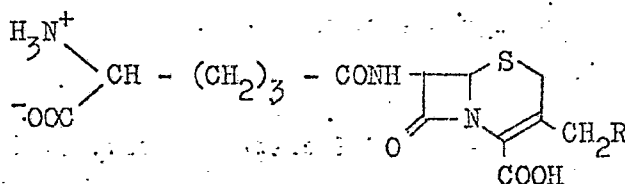
UNE A-4 MOD. 3106

UTILICESE COMO PRIMERA PAGINA DE LA MEMORIA

**POOR  
QUALITY**

1 Esta invención se refiere a un método para la se-  
paración de una mezcla de cefalosporinas que comprende al  
menos dos de los compuestos de cefalosporina siguientes, a  
saber, desacetilcefalosporina C (a la que de aquí en adelan  
5 te se hará referencia abreviadamente como D-CPC), desaceto-  
xi-cefalosporina C (de aquí en adelante, DA-CPC) o cefalos-  
porina C (de aquí en adelante, CPC), en cualquiera de ellas.

Los productos D-CPC, DA-CPC y CPC, que tienen las  
fórmulas estructurales presentadas abajo, son todos ellos  
10 compuestos intermedios importantes valiosos para la produc-  
ción de cefalosporinas semisintéticas.



15 R: -OCOCH<sub>3</sub> --- CPC  
: -OH --- D-CPC  
: -H --- DA-CPC

20 Generalmente se exige un procedimiento complicado  
para aislar CPC, D-CPC y DA-CPC separadamente a partir del  
caldo de fermentación de un microorganismo que produce y acu-  
mula concurrentemente dos o más miembros de CPC, D-CPC y  
DA-CPC (tales como las cepas descritas en la patente de  
25 EE.UU. 3.979.260, patente de Canadá 1.016.091, patente bri-  
tánica 1.474.740, por ejemplo). Así, aunque la separación de  
estos componentes ha sido llevada a cabo hasta ahora por cro-  
matografía en columnas de celulosa, una separación satisfac-  
toria puede conseguirse solamente cuando: (1) el caldo de  
30 cultivo o filtrado se concentra previamente a un volumen lo

1 más pequeño posible, (2) se emplea una cantidad muy grande  
de celulosa, y (3) se invierte mucho tiempo para la elución  
a través de la gran cantidad de celulosa y la concentración  
del producto de elución obtenido. Estas y otras desventajas  
5 han hecho que el procedimiento convencional que utiliza cro-  
matografía en columna de celulosa resulte insatisfactorio  
para fines comerciales. Se ha intentado también reemplazar  
la celulosa con carbono activado para las operaciones cromatográficas (p. ej. patente de EE.UU. 3.926.973), pero tal  
10 procedimiento se ha propuesto únicamente para separar CPC,  
cefalosporina N y pigmentos unos de otros, y los autores de  
la presente invención no conocen en absoluto que se haya em-  
pleado nunca carbono activado para la interseparación de  
CPC, D-CPC y DA-CPC.

15 En algunos casos (p. ej. patente de EE.UU.  
3.979.260), patente de Canadá 1.016.091, patente británica  
1.474.740, etc.), se ha empleado carbono activado en un sim-  
ple medio de purificación para purificar soluciones acuosas  
brutas que contienen dos o más miembros de CPC, D-CPC y  
20 DA-CPC, pero este adsorbente no se ha empleado nunca para  
la interseparación de derivados de cefalosporina.

Las investigaciones emprendidas para desarrollar  
un método de separación de una mezcla de cefalosporina en  
sus componentes tales como CPC, D-CPC y DA-CPC condujeron a  
25 los autores de la presente invención al descubrimiento de  
que puede conseguirse una interseparación comercialmente  
ideal de D-CPC, DA-CPC y CPC por adsorción de estos compues-  
tos sobre carbono activado y realización de una elución  
fraccionada de los mismos con agua que puede contener un pe-  
queño volumen de un disolvente o disolventes orgánicos. Es-

1 ta invención se ha desarrollado sobre la base del descubri-  
miento arriba indicado. Esta invención se refiere, por con-  
siguiente, a un método de separación individual de tales  
5 compuestos de cefalosporina aprovechando su diferente acti-  
vidad para el carbono activado en agua que contiene 0 a 20  
por ciento (volumen/volumen) de uno o varios disolventes or-  
gánicos. Más particularmente, la invención se refiere a un  
método de separación individualizada de D-CPC, DA-CPC y CPC  
10 caracterizado por poner en contacto una solución acuosa bruta  
que contiene al menos dos miembros de CPC, D-CPC y DA-CPC  
con carbono activado para adsorber las cefalosporinas sobre  
el carbono y efectuar una elución fraccionada de las mismas  
con agua que contiene 0 a 20 por ciento (volumen/volumen)  
de uno o varios disolventes orgánicos.

15 La solución acuosa bruta de CPC, D-CPC y DA-CPC a  
la que es aplicable el método de esta invención es una solu-  
ción que contiene al menos dos miembros de CPC, D-CPC y  
DA-CPC, y puede ser cualquiera de los caldos de fermenta-  
ción de cefalosporinas y caldos parcialmente purificados de  
20 fermentación de cefalosporinas, p. ej. eluatos de resinas  
cambiadoras de ion, concentrados, aguas madres de cristali-  
zación, etcétera. Cuando está presente D-CPC, es particular-  
mente ventajoso aplicar el método de esta invención a una  
solución parcialmente purificada que contiene ciertas sales.  
25 Así, la adsorción sobre carbono activado es intensa cuando  
están simultáneamente presentes sales tales como haluros de  
metal alcalino o de metal alcalino-térreo (p. ej. cloruro  
de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, etc.),  
sulfatos de metal alcalino (p. ej. sulfato de sodio, etc.),  
30 nitratos de metal alcalino (p. ej. nitrato de sodio, etc.),

1 formiatos de metal alcalino (p. ej. formiato de sodio, etc.),  
acetatos de metal alcalino (p. ej. acetato de sodio, etc.),  
citratos de metal alcalino (p. ej. citrato de sodio, etc.),  
y/o fosfatos de metal alcalino (p. ej. fosfato de sodio,  
5 etc.) en una proporción de 0,01 a 2 moles y, preferiblemen-  
te, 0,05 a 0,5 moles.

El carbono activado que se emplea para los fines  
de esta invención puede ser cualquiera de los carbonos acti-  
vados obtenidos por activación con vapor de agua o activa-  
10 ción con productos químicos (p. ej. cloruro de zinc) de car-  
bono de serrín, carbono de cáscara de coco, carbón y otros  
materiales carbonosos, aunque son particularmente deseables  
los carbonos activados con cloruro de zinc. Adicionalmente,  
es deseable que tales carbonos sean granulares y tengan una  
15 granulometría comprendida entre 2 mm y 297 micras (10 a 50  
mallas).

En la realización de esta invención, dicha solu-  
ción acuosa bruta que contiene al menos dos miembros de  
CFC, D-CFC y DA-CFC se pone primeramente en contacto con car-  
20 bono activado para adsorber de este modo dichos solutos so-  
bre el carbono.

Quando se emplea una columna para la adsorción,  
es ventajoso verter la solución desde el extremo superior  
de la columna de tal modo que pueda obtenerse una mayor efi-  
25 ciencia de elución. Si bien la longitud de la columna y la  
velocidad del contacto deben seleccionarse de modo apropia-  
do, dicha velocidad de contacto es normalmente 0,1 a 2,0 VE  
(VE representa velocidad espacial, que se define como la re-  
lación del volumen de material de entrada al volumen del es-  
30 pacio de reacción, esto es, la zona rellena de la columna,

1 en condiciones normales y por unidad de tiempo) y, preferi-  
blemente, está comprendida entre 0,5 y 1,0.

Los compuestos considerados, esto es, al menos  
dos miembros de CPC, D-CPC y DA-CPC, que se han adsorbido  
5 así sobre el carbono activado, emergen de la columna en el  
orden de D-CPC, DA-CPC y CPC cuando se eluyen con una solu-  
ción acuosa que contiene 0 a 20 por ciento (volumen/volu-  
men) de un disolvente orgánico (o cuando el disolvente orgá-  
nico tiene una solubilidad inferior a 20% (volumen/volumen)  
10 con respecto al agua, una solución acuosa que contiene el  
mismo disolvente hasta el punto de saturación como máximo).  
El disolvente orgánico puede ser prácticamente cualquier di-  
solvente que sea soluble incluso en una proporción mínima  
en agua. Sin embargo, por consideraciones económicas, son  
15 ventajosos alcoholes que tengan preferiblemente 1 a 8 áto-  
mos de carbono (p. ej. metanol, etanol, propanol, alcohol  
isopropílico, butanol, alcohol isobutílico, alcohol amíli-  
co, alcohol isoamílico, ciclohexanol, etc.), éteres que ten-  
gan preferiblemente 1 a 6 átomos de carbono (dioxano, tetra  
20 hidrofurano, éter metil-etílico, etc.), cetonas que tengan  
preferiblemente 1 a 6 átomos de carbono (acetona, metil-etil-  
cetona, dietil-cetona, etc.), ésteres que tengan preferi-  
blemente 1 a 12 átomos de carbono (p. ej. acetato de etilo,  
acetato de butilo, etc.). El disolvente orgánico puede uti-  
25 lizarse como una mezcla de los disolventes arriba indicados.  
De estos disolventes, los más deseables son los alcoholes,  
siendo el mejor el metanol. El procedimiento de elución más  
simple es uno en el que la concentración del disolvente no  
se varía en el curso de la elución, aunque puede emplearse  
30 también un procedimiento de elución con una concentración

1 variada del disolvente. Por ejemplo, cuando se ha adsorbido  
D-CPC, es ventajoso realizar una primera elución con agua  
como disolvente para recuperar una fracción que contiene  
D-CPC solo y, después, una segunda elución con una solución  
5 acuosa que contiene 0,1 a 20 por ciento (volumen/volumen)  
de un disolvente orgánico. Para asegurar una eficiencia de  
separación mejorada, pueden utilizarse cromatografía y  
otros procedimientos que se emplean convencionalmente en la  
técnica de la cromatografía en columna. El eluato se recoge  
10 en fracciones alícuotas, y las fracciones ricas en cada com-  
puesto de cefalosporina desecado pueden detectarse por un  
procedimiento de detección adecuado (p. ej. cromatografía en  
capa delgada, electroforesis sobre papel, cromatografía en  
fase líquida de alta eficiencia, etc.).

15 Las fracciones que contienen el compuesto conside-  
rado en particular pueden reunirse, neutralizarse con una  
base tal como NaOH, KOH o amoníaco, concentrarse, liofili-  
zarse, tratarse con un disolvente o tratarse de las restau-  
tes maneras rutinarias, para obtener la sal correspondien-  
20 te. El conjunto de las fracciones, o una solución acuosa de  
la sal correspondiente derivada de ellas, puede desalarse  
también con una resina cambiadora de ion para obtener el  
ácido libre y después, finalmente, concentrarse, precipitar  
se por adición de un disolvente, liofilizarse o purificarse  
25 de cualquier otro modo por un procedimiento establecido pa-  
ra aislar el compuesto en la forma libre. Además, las frac-  
ciones que contienen el compuesto considerado pueden poner-  
se en contacto directamente con un agente de acilación, re-  
cuperándose el derivado soluble en grasa resultante por ex-  
30 tracción con un disolvente. El procedimiento de purificación

1 arriba mencionado y otros pueden utilizarse solos o en una  
combinación adecuada.

5 Los ejemplos siguientes tienen por objeto ilustrar esta invención con mayor detalle y no deben interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de la invención. En esta memoria descriptiva, "g", "mg", "l", "ml", "cm", "p", "vol", "E", "min", "h", "diám", "temp", "r.p.m.", "CIAE", "CCD", "UV", "REM" e "IR" son abreviaturas de "gramo", "miligramo", "litro", "mililitro", "centímetro", "peso", "volumen", "Mol", "minuto", "hora", "diámetro", "temperatura", "revoluciones por minuto", "cromatografía líquida de alta eficiencia", "cromatografía en capa delgada", "espectro de rayos ultravioleta", "espectro de resonancia magnética nuclear", y "espectro de rayos infrarrojos". Las resinas denominadas "Amberlite" son productos fabricados por Rohm and Haas Co. en EE.UU. Como carbono activado de grado cromatográfico se utiliza uno fabricado por Takeda Chemical Industries, Ltd. en Japón.

10

15

#### Ejemplo 1

20 En 25 litros de tampón de acetato de sodio (pH 6,0, 0,2 M) se disuelven 25 g de cada uno de los compuestos CPG, DA-CPC y D-CPC, y la solución se hace pasar a través de una columna (25 cm de diámetro x 163 cm de altura) de 80 litros de carbono activado de calidad cromatográfica suspendido previamente en agua, a VE = 1,0 (80 litros/h).

25

La columna se lava con 80 litros de agua, seguido por el paso de 240 litros de EtOH al 10% a VE = 1,0 (80 litros/h). El eluato se recoge en fracciones de 8 litros que se ensayan por CIAE. La CIAE da una curva de elución que corresponde a la primera mitad de la figura 1. Está claro

30

1 que D-CFC y DA-CFC se eluyen según dos patrones distintos.  
(Puede hacerse pasar una cantidad adicional de EtOH al 10%  
para eluir CFC, pero con objeto de economizar tiempo de elu-  
5 ción y obtener una curva de elución mejor definida, el elu-  
yente se reemplaza por EtOH al 20% y el eluato se recoge en  
fracciones de 8 litros). Cuando se ensaya por CLAE, se ob-  
tiene una curva de elución que corresponde a la segunda mi-  
tad de la figura 1. Cada fracción se aplica a una placa cro-  
matográfica de capa delgada de polvo de celulosa microcrista-  
10 talina (Tokyo Kasei, K.K., Japón) y se revela el cromatogra-  
ma con n-butanol-ácido acético-agua (3:1:1, vol/vol), y se  
seca al aire. La imagen formada por reacción coloreada con  
ninhidrina muestra una mancha para cada uno de los valores  
Rf = 0,15 para D-CFC, Rf = 0,20 para CFC y Rf = 0,30 para  
15 DA-CFC.

Las fracciones núms. 10 a 17, que son ricas en  
D-CFC, se combinan, se ajustan a pH 6,5 con NaOH y se con-  
centran a presión reducida. Al jarabe resultante se añade  
etanol para cristalizar el D-CFC como sal monosódica. Los  
20 cristales se recuperan por filtración y se secan. Por el  
procedimiento anterior se obtienen 20 g de D-CFC. Na.3,5  
H<sub>2</sub>O. Se encuentra que este producto es idéntico a una mues-  
tra auténtica de D-CFC.Na en propiedades físicas, químicas  
y biológicas, p. ej. espectro antimicrobiano, cromatografía  
25 en papel, CCD, UV, RMN e IR.

Después de ello, las fracciones núms. 18 a 28,  
que son ricas en DA-CFC, se combinan, se ajusta a pH 6,5  
con NaOH y se concentran a presión reducida. Al jarabe re-  
sultante se añade etanol, después de lo cual se cristaliza  
30 la sal DA-CFC.Na. Los cristales se recuperan por filtración

1 y se secan. Por el procedimiento anterior se obtienen 18 g  
de la sal DA-CPC.Na. Se encuentra que este producto es idéntico a una muestra auténtica de sal DA-CPC.Na en propiedades físicas, químicas y biológicas, p. ej. espectro antimicrobiano, cromatografía en papel, CCD, UV, IR y RMN.  
5

Por último, las fracciones núms. 41 a 51, que son ricas en CPC, se combinan, se ajustan a pH 6,5 con NaOH y se concentran a presión reducida. Al jarabe resultante se añade etanol, después de lo cual se separa la sal CPC.Na en forma de cristales. Los cristales se recogen por filtración y se secan. Por el procedimiento anterior se obtienen 15 g de CPC.Na.2H<sub>2</sub>O. Se encuentra que estos cristales son idénticos a una muestra auténtica de sal CPC.Na en propiedades físicas, químicas y biológicas, p. ej. espectro antimicrobiano, cromatografía en papel, CCD, UV, IR y RMN.  
10  
15

Se toman 5 gramos de cada una de estas sustancias CPC, D-CPC y DA-CPC y se disuelven cada una de ellas en 50 ml de agua. Se das columnas rellenas cada una con 15 ml de Amberlite IR-120 (forma H<sup>+</sup>) se lavan previamente y se enfrían con agua fría a 5°C. Las soluciones arriba indicadas se desalan pasándolas a través de las columnas a VE = 3 - 5, y todas y cada una de las soluciones desaladas se liofilizan. Por el procedimiento anterior se obtienen 3,2 g de CPC, 3,5 g de D-CPC y 3,3 g de DA-CPC.  
20

25 Ejemplo 2

Se pasan 250 ml de tampón de citrato de sodio (pH 8,0, 0,2 M) que contiene 2.475 γ/ml de CPC y 2.200 γ/ml de D-CPC a través de una columna (2 cm de diámetro x 32 cm de altura) rellena con 100 ml de carbono activado de calidad cromatográfica a VE = 1,0 (100 ml/h). La columna se lava  
30  
16109

1 con 100 ml de agua pura y, luego, se hace pasar metanol al  
5% a VE = 1,0 (100 ml/h), con lo que se obtienen 200 ml de  
un primer eluato. Los contenidos de CPC y D-CPC de este pri-  
mer eluato se ensayan por CIAE. El cromatograma muestra que  
5 el eluato contiene 523 mg (rendimiento, 95%) de D-CPC, sin  
prácticamente evidencia sustancial alguna de CPC. La colum-  
na anterior se riega posteriormente con metanol al 5% a VE  
= 1,0 para recoger 30 ml de una segunda fracción y, luego,  
30 ml de una tercera fracción. Después de ello, se pasa me-  
10 tanol al 20% a VE = 1,0 para obtener 340 ml de un cuarto  
eluato. La tercera fracción (30 ml) obtenida con metanol al  
20%, y la muestra se ensaya por CIAE. El cromatograma mues-  
tra la presencia de 464 mg (rendimiento, 75%) de CPC, sin  
prácticamente evidencia sustancial alguna de D-CPC. Las  
15 fracciones arriba indicadas se concentran y cristalizan res-  
pectivamente como en el ejemplo 1 para recuperar 430 mg de  
D-CPC.Na.3,5 H<sub>2</sub>O y 390 mg de CPC.Na.2H<sub>2</sub>O.

### Ejemplo 3

20 436 ml de tampón de acetato de sodio (pH 7,0 0,2  
M) que contiene 269 mg de CPC y 1.522 mg de D-CPC se pasan  
a través de una columna (2 cm de diámetro x 64 cm de altura)  
que contiene 200 ml de carbono activado de calidad cro-  
matográfica suspendido previamente en agua, a VE = 1,0 (200  
25 ml/h), con lo que se adsorben la D-CPC y la CPC. Después de  
ello, se pasa cetona al 1% a 10°C a VE = 1,0, recogién-  
dose el eluato en fracciones de 50 ml. Cada una de las fraccio-  
nes se ensaya por CCD como en el ejemplo 1 y las fracciones  
apropiadas (fracciones núms. 2-12 en este ejemplo) se combi-  
nan y se ensayan por CIAE. El cromatograma muestra la pre-  
30 sencia de 1.430 mg (rendimiento, 94%) de D-CPC, sin sustan-

1 cialmente evidencia alguna de CPC. Después de ello, una vez  
que se han recogido las fracciones núms. 14-24, se hace pa-  
sar acetona al 20% a VE = 1,0 hasta que se obtiene la frac-  
ción nº 29. Se combinan las fracciones núms. 14-29 y se en-  
5 sayan los contenidos de D-CPC y CPC del conjunto por CIAE.  
Este cromatograma muestra la presencia de 172 mg de CPC  
(rendimiento, 63,9%), sin evidencia alguna de D-CPC. Se  
cristalizan cada uno de estos eluatos como en el ejemplo 1  
para recuperar 1,2 g de D-CPC.Na.3,5H<sub>2</sub>O y 150 mg de  
10 CPC.Na.2H<sub>2</sub>O.

#### Ejemplo 4

441 ml de tampón de acetato de sodio (pH 7,0, 0,2  
M) que contienen 272 mg de CPC y 1.539 mg de D-CPC se some-  
ten a cromatografía en una columna (2 cm de diámetro x 64  
15 cm de altura) de 200 ml de carbono activado de calidad cro-  
matográfica suspendido previamente en agua, a VE = 1,0 (200  
ml/h), con lo que se adsorben la CPC y la D-CPC. Después de  
lavar la columna con 200 ml de agua pura, se pasa cetato de  
etilo al 1% a 10°C a VE = 1,0, recogándose el eluato en  
20 fracciones de 50 ml. Cada una de las fracciones se ensaya  
por CCD, se combinan las fracciones apropiadas y los conte-  
nidos de D-CPC y CPC del conjunto se ensayan por CIAE. Las  
fracciones núms. 2-18 contienen 1.462 mg (rendimiento, 95%)  
de D-CPC, sin evidencia sustancial alguna de CPC. Se encuen-  
25 tra que las fracciones núms. 20-25 contienen 233 mg (rendi-  
miento, 85,6%) de CPC, sin evidencia sustancial alguna de  
D-CPC.

#### Ejemplo 5

447 ml de tampón de acetato de sodio (pH 7,0, 0,2  
M) que contienen 275 mg de CPC y 1.560 mg de D-CPC se hacen  
30

1 pasar a través de una columna rellena con 200 ml de carbono  
activado de calidad cromatográfica suspendido previamente  
en agua, a VE = 1,0 (200 ml/h); con lo que se adsorben la  
CFC y la D-CFC. Después de lavar la columna con 200 ml de  
5 agua pura, se hace pasar tetrahidrofurano al 0,1% a 10°C a  
VE = 1,0, recogién dose el eluato en fracciones de 50 ml.  
Las fracciones núms. 1-15 contienen un total de 1.443 mg de  
D-CFC (rendimiento, 92,5%), sin evidencia sustancial alguna  
de CFC. Después de ello, se pasan 250 ml de tetrahidrofura-  
10 no al 0,5% a 10°C y a VE = 1,0, seguido por el paso de te-  
trahidrofurano al 1% a 10°C, de nuevo a VE = 1,0. Las frac-  
ciones núms. 21-33 se combinan y se ensayan por GLAE. El  
cromatograma muestra la presencia de 213,2 mg de CFC (rendi-  
miento, 78%), sin evidencia sustancial alguna de D-CFC.

15

Ejemplo 6

250 ml de tampón de formiato de sodio (pH 6,0, 0,2  
M) que contienen 1.125 mg de CFC y 1.075 mg de D-CFC se ha-  
cen pasar a través de una columna de 200 ml de carbono acti-  
vado de calidad cromatográfica suspendido previamente en  
20 agua, a VE = 1,0 (200 ml/h), con lo que se adsorben CFC y  
D-CFC. La columna se lava con 200 ml de agua pura. Después  
de ello, se pasan 800 ml de agua a 10°C y a VE = 1,0 (200  
ml/h), recogién dose el eluato en fracciones de 50 ml. Des-  
pués de ello, se pasan 1.100 ml de metanol al 20% a VE =  
25 1,0. Las fracciones núms. 5-16 contienen 908 mg de D-CFC  
(rendimiento, 84%), sin evidencia sustancial alguna de CFC.  
Las fracciones núms. 18-38 contienen 825 mg de CFC (rendi-  
miento, 73%), sin evidencia sustancial alguna de D-CFC.

Ejemplo 7

Un matraz de Sakaguchi de 2 litros se llena con

30

16109

1 500 ml de un medio de cultivo de siembra compuesto por 3,0%  
de sacarosa, 1,5% de extracto de carne, 0,5% de licor de ma  
ceración de maíz y 0,15% de  $\text{CaCO}_3$ , e inoculado con Cephalos  
porium acremonium ATCC 14553. El matraz inoculado se incuba  
5 en un aparato de sacudidas alternativas a 28°C durante 3  
días. Por otra parte, un depósito de fermentación de 50 li-  
tros de acero inoxidable se carga con 30 litros de un medio  
compuesto por 3,0% de sacarosa, 3,2% de harina de soja cru-  
da, 0,5% de DL-metionina y 0,15% de  $\text{CaCO}_3$ , esterilizado del  
10 modo rutinario y enfriado. El medio del depósito se inocula  
asépticamente con el cultivo de siembra anterior, y se lle-  
va a cabo la fermentación bajo agitación y aireación a 28°C  
(aireación, 100%/min; 200 r.p.m.). Después de 120 horas de  
fermentación, el caldo se separa y se filtra. Se ensayan  
15 los contenidos de CPC y D-CPC del filtrado por CIAE. Los re-  
sultados son 135  $\gamma$ /ml de CPC y 25  $\gamma$ /ml de D-CPC. A 25,7 li-  
tros de este filtrado se añade penicilinasa (Schwarz-Mann  
Co., Ltd.), con lo que la cefalosporina N se descompone por  
completo. La solución se ajusta a pH 4,0 con ácido sulfúri-  
co diluido, se separan por filtración la materia insoluble  
20 y se enfría el filtrado a 10°C y se cromatografía en una co-  
lumna (10 cm de diámetro x 64 cm de altura) de 5 litros de  
carbón activado de calidad cromatográfica suspendido previa-  
mente en agua. La columna se lava con 5 litros de agua pu-  
ra. Después de ello, se lleva a cabo la elución con acetona  
25 acuosa al 40% a 10°C y 15 litros del eluato se enfrían a  
10°C y se hacen pasar a través de una columna (3 cm de diá-  
metro x 71 cm de altura) que contiene 500 ml de Amberlite  
IRA-402 (forma de acetato), con lo que se adsorben la D-CPC  
y la CPC. Se lava la columna con 2 litros de agua pura y,  
30

1 luego, se lleva a cabo la elución con 2,5 litros de tampón  
de acetato de sodio 0,2 M (10°C, pH 7,0) a VE = 1,0 (500  
ml/h).

5 Este eluato se hace pasar a través de una columna  
(2 cm de diámetro x 127 cm de altura) que contiene 400 ml  
de carbono activado de calidad cromatográfica suspendido  
previamente en agua, a VE = 1,0 (400 ml/h), seguido por la-  
vado con 400 ml de agua pura. Después de ello, se hace pa-  
sar metanol al 1% a 10°C a VE = 1,0, recogándose el eluato  
10 en fracciones de 100 ml. Las fracciones núms. 5-11 se reú-  
nen, y se lleva a cabo una CCD sobre celulosa microcristali-  
na con un sistema disolvente constituido por n-butanol-áci-  
do acético-agua (3:1:1). El cromatograma muestra una sola  
mancha que corresponde sustancialmente a D-CPC sola para Rf  
15 = 0,15, prácticamente sin evidencia alguna de CPC. La misma  
columna se eluye después con metanol al 20% a VE = 1,0 y  
las fracciones apropiadas (núms. 12-32 en este caso) se com-  
binan y se ensayan por CCD en las mismas condiciones que  
arriba. El cromatograma muestra una sola mancha que corres-  
20 ponde sustancialmente a CPC sola para Rf = 0,28, sin eviden-  
cia alguna de D-CPC. El conjunto arriba indicado de fraccio-  
nes de D-CPC (núms. 5-11) se neutraliza con NaOH y se con-  
centra a presión reducida (temperatura inferior igual o in-  
ferior a 20°C) hasta que el ácido libre de D-CPC es 25 a  
25 30% (peso/vol). Se añade a este concentrado etanol, con lo  
que se forman cristales. Después de dejar que el sistema  
cristalice a 5°C durante una noche, se recogen los crista-  
les por filtración y se secan. Se obtienen así cristales de  
color amarillo pálido de sal D-CPC.Na. La cristalización re-  
30 petida de las aguas madres da un total de 60 mg de sal

1 D-CPC.Na. Estos cristales brutos se purifican ulteriormente  
y los cristales de sal D-CPC.Na resultantes se comparan con  
una muestra auténtica de sal D-CPC.Na. Las propiedades físi-  
cas, químicas y biológicas de este producto están en concor-  
5 dancia satisfactoria con las de una muestra auténtica de  
sal D-CPC.Na. Después de ello, las fracciones de CPC (núms.  
12-32) se neutralizan con NaOH y se tratan como se describe  
arriba con referencia a la D-CPC, con lo que se precipita  
CPC. Este procedimiento da un total de 240 mg de polvo de  
10 sal CPC.Na. Esta se purifica ulteriormente y se compara con  
una muestra auténtica de sal CPC.Na. Existe una concordancia  
satisfactoria en las propiedades físicas, químicas y  
biológicas.

#### Ejemplo 8

15 Se precultiva Cephalosporium acremonium K-121  
(ATCC 20427) como en el ejemplo 7. Por otra parte, un depó-  
sito de fermentación de acero inoxidable de 50 litros se  
carga con 30 litros de un medio constituido por 6,0% de sa-  
carosa, 5,0% de glucosa, 3,0% de torta de cacahuete, 1,0%  
20 de DL-metionina y 0,15% de CaCO<sub>3</sub>, esterilizado de la manera  
rutinaria y enfriado. El depósito se inocula asépticamente  
con el cultivo de siembra anterior y se lleva a cabo la fer-  
mentación bajo agitación y aireación a 28°C durante 190 ho-  
ras (aireación, 100%/min; agitación a 250 r.p.m.). Al final  
25 del período de incubación, el caldo se separa y se elimina  
la materia sólida para obtener 25 litros de filtrado. El  
contenido de CPC de este filtrado es 10.500 γ/ml. Se añade  
a este filtrado la D-CPC obtenida por el procedimiento de  
la patente de EE.UU. n° 3.926.729 a una concentración de  
30 1.000 γ/ml.

1 Veinticinco litros del filtrado anterior que con-  
tiene 10.500  $\gamma$ /ml de CPC y 1.000  $\gamma$ /ml de D-CPC se enfrían a  
10°C y se hacen pasar en serie a través de una columna de  
2,8 litros de Amberlite IRC-50 (forma  $H^+$ ) y una columna de  
5 17,8 litros de Amberlite IRA-402 (forma acetato) a un cau-  
dal de 17,8 litros/h, con lo que se adsorben la D-CPC y la  
CPC. Las columnas se lavan en serie con 70 litros de agua  
pura a 10°C y la columna de Amberlite IRA-402 se eluye con  
10 tampón de acetato de sodio a 10°C (pH 7,5, 0,2 M) al caudal  
de 17,8 litros/h para recuperar 89 litros de eluato (pH  
7,5). Este eluato se cromatografía en una columna (14 cm de  
diámetro x 136 cm de longitud) de 21 litros de carbono acti-  
vado de calidad cromatográfica suspendido previamente en  
agua, a 10°C y al caudal de 10 litros/h, con lo que se ad-  
15 sorben la CPC y la D-CPC. La columna se lava con 21 litros  
de agua y se realiza la elución con 56 litros de metanol  
acuoso al 1% a 10°C durante 1 hora, al caudal de 10 li-  
tros/h, recogiendo el eluato en fracciones de 5,3 litros.  
Después de ello, se pasan 110 litros de metanol acuoso al  
20 20% a 10°C al caudal de 10 litros/h, recogiendo el eluato  
en fracciones de 5,3 litros.

Cada fracción se ensaya por CCD y las fracciones  
núms. 5-11 que dan una sola mancha de D-CPC para  $R_f = 0,15$   
y las fracciones núms. 12-32 que dan una sola mancha de CPC  
25 para  $R_f = 0,28$  se combinan respectivamente. Las fracciones  
de D-CPC, esto es, las fracciones núms. 5-11, se neutrali-  
zan con NaOH y, después, se concentran y cristalizan como  
en el ejemplo 1 para recuperar un total de 15 g de crista-  
los de sal D-CPC.Na. Las fracciones de CPC, esto es, las  
30 fracciones núms. 12-32, se neutralizan de modo análogo, se

1 concentran y se cristalizan como en el ejemplo 1 para recuperar un total de 135 g de cristales de sal CPC.Na.

#### Ejemplo 9

5 De acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 7, se incuba Cephalosporium acremonium K-121 (ATCC 20427) durante 96 horas. Al final del período de incubación, el caldo de fermentación se separa y se elimina la materia sólida para obtener 26,5 litros de filtrado. El contenido de CPC de este filtrado es 4.700  $\gamma$ /ml. Se añade a este filtrado la D-CPC preparada por el procedimiento de la patente de EE.UU. 3.926.728 a una concentración de 5.000  $\gamma$ /ml.

10 Después de ello, 26,5 litros del filtrado anterior que contiene 4.700  $\gamma$ /ml de CPC y 5.000  $\gamma$ /ml de D-CPC se enfrían a 10°C y se hacen pasar en serie a través de una columna de 2,5 litros de Amberlite IRC-50 (forma H<sup>+</sup>) y una columna de Amberlite IRA-402 (forma acetato) al caudal de 16 litros/h, con lo que se adsorben la CPC y la D-CPC. Las columnas se lavan luego en serie con 64 litros de agua pura a 10°C y se lleva a cabo la elución en la columna de Amberlite IRA-402 con tampón de acetato de sodio (pH 7,0, 0,2 M, 10°C) al caudal de 16 litros/h, para recuperar 80 litros de eluato (pH 7,0).

15 Este eluato se hace pasar a través de una columna (14 cm de diámetro x 136 cm de altura) de 19 litros de carbono activado de calidad cromatográfica suspendido previamente en agua, al caudal de 10 litros/h, con lo que se adsorben la CPC y la D-CPC. La columna se lava con 19 litros de agua fría y, luego, se pasa más agua a 10°C a un caudal de 19 litros/h, con lo que se obtienen 42,8 litros de un eluato claro e incoloro. La CCD de este eluato da sustan-

1 cialmente una sola mancha de D-CPC. Posteriormente, se pa-  
san 33,3 litros de etanol al 3% a 10°C, y después de sepa-  
rar 9,5 litros de las fracciones eluidas en primer lugar,  
se reúnen 23,8 litros de las últimas fracciones. Estas últi-  
5 mas contienen solamente CPC. A continuación se pasan 57 li-  
tros de etanol acuoso al 15% a 10°C a un caudal de 19 li-  
tros/h, y el eluato se combina con los 23,8 litros de elua-  
to anterior (etanol acuoso al 3%). El ensayo de este eluato  
combinado (80,8 litros) por CLAE demostró la presencia de  
10 86 g de CPC, sin evidencia sustancial alguna de D-CPC.

Las fracciones de D-CPC y CPC así obtenidas se  
concentran independientemente y se cristalizan como en el  
Ejemplo 1 para recuperar 80 g de cristales de sal D-CPC.Na  
y 66 g de cristales de sal CPC.Na.

15

#### Ejemplo 10

Por el procedimiento descrito en el ejemplo 7, se  
incuba Cephalosporium acremonium K-121 (ATCC 20427) duran-  
te 48 horas. Al final del período de incubación, el caldo  
se separa y se elimina la materia sólida para obtener 27,2  
20 litros de filtrado. El contenido de CPC de este filtrado es  
1.020  $\gamma$ /ml. A este filtrado se añade la D-CPC obtenida por  
el procedimiento de la patente de EE.UU. 3.926.729 a una  
concentración de 9.000  $\gamma$ /ml.

25 27,2 litros del filtrado anterior que contiene  
1.020  $\gamma$ /ml de CPC y 9.000  $\gamma$ /ml de D-CPC se enfrían a 10°C y  
se hacen pasar en serie a través de una columna de 2,7 li-  
tros de Amberlite IRC-50 (forma H<sup>+</sup>) y una columna de 17 li-  
tros de Amberlite IRA-410 (forma acetato) a un caudal de 17  
litros/h, con lo que se adsorben la CPC y la D-CPC. Después  
de lavar con 68 litros de agua fría, se lleva a cabo la elu-

30

16109

1 ción sobre la columna de Amberlite IRA-410 con tampón de  
acetato de sodio (pH 7,0, 0,2 M, 10°C) a un caudal de 17 li-  
tros/h, para recuperar 85 litros de eluato (pH 7,0). Este  
5 eluato se cromatografía en una columna (14 cm de diámetro x  
130 cm de altura) de 20 litros de carbono activado de cali-  
dad cromatográfica suspendido previamente en agua, a un cau-  
dal de 20 litros/h, con lo que se adsorben la CPC y la  
D-CPC. Después de lavar con 20 litros de agua fría, se lle-  
va a cabo la elución con 75 litros de alcohol isopropílico  
10 acuoso al 1% a 10°C y a un caudal de 20 litros/h. El ensayo  
de este eluato (75 litros) por CIAE revela la presencia de  
204 g de D-CPC en este eluato (75 litros), sin evidencia  
sustancial alguna de CPC. Después de ello, se hace pasar al  
cohol isopropílico acuoso al 5% a un caudal de 20 litros/h,  
15 y después de desechar 10 litros de las fracciones de cabe-  
za, se pasan 60 litros más para obtener un eluato claro de  
color amarillo pálido. El ensayo de este eluato reveló la  
presencia de 12 g de CPC. Estas fracciones de D-CPC y CPC  
se concentran independientemente y se cristalizan para recu-  
20 perar 190 g de cristales de sal D-CPC.Na y 6 g de cristales  
de sal CPC.Na.

#### Ejemplo 11

Un matraz Sakaguchi de 2 litros se llena con 500  
ml de un medio constituido por 5% de glucosa, 1% de harina  
25 de semilla de algodón, 0,5% de harina de soja bruta, 0,5%  
de extracto de levadura, 0,5% de peptona y 1% de  $\text{CaCO}_3$ , y  
después de esterilización, se inocula con Paecilomyces cer-  
neus C-2237 (IFO 9729). El matraz inoculado se incuba en un  
aparato de sacudidas alternativas a 28°C durante 3 días.  
30 Por otra parte, un depósito de fermentación de 50 litros de

1 acero inoxidable se carga con 30 litros de un medio consti-  
tuido por 8% de glucosa, 2% de harina de semilla de algodón  
y 1% de  $\text{CaCO}_3$ , esterilizado de la manera rutinaria y enfria-  
do. Este depósito se inocula asépticamente con el cultivo  
5 preparado arriba y se lleva a cabo la fermentación con ai-  
reación y agitación a  $24^\circ\text{C}$  durante 164 horas (aireación 20  
litros/min, agitación 230 r.p.m.).

Al final del período de fermentación, el caldo de  
fermentación se separa y se elimina la materia sólida para  
10 obtener 25 litros de filtrado. Este filtrado contiene  
110  $\gamma/\text{ml}$  de CPC, 30  $\gamma/\text{ml}$  de D-CPC y 155  $\gamma/\text{ml}$  de DA-CPC. Se  
añade a este caldo penicilinasas (Schwarz-Mann Co., Ltd.) pa-  
ra descomponer por completo la cefalosporina N y, después  
de ajustar a pH 4,0 con ácido sulfúrico diluido, se separa  
15 la materia insoluble por filtración. El filtrado se enfría  
a  $5^\circ\text{C}$  y se cromatografía en una columna (10 cm de diámetro  
x 64 cm de altura) de 5,0 litros de carbono activado de ca-  
lidad cromatografía suspendido previamente en agua. Después  
de lavar con agua fría, se lleva a cabo la elución con acé-  
20 tona acuosa al 50% a  $5^\circ\text{C}$ . El eluato (15 litros, pH 5,0) se  
enfria a  $10^\circ\text{C}$  y se cromatografía en una columna de 3,5 li-  
tros de Amberlite IRA-410 (forma  $\text{Cl}^-$ ), con lo que se adsor-  
ben la CPC, la D-CPC y la DA-CPC. Después de lavar, se lle-  
va a cabo la elución con 10 litros de solución de cloruro  
25 de sodio 0,2 M a  $5^\circ\text{C}$  y a  $\text{VE} = 1,0$  (3,5 litros/h). Este elua-  
to se pasa a través de una columna (5 cm de diámetro x 300  
cm de altura) de 6 litros de carbono activado de calidad cro-  
matográfica suspendido previamente en agua, a  $\text{VE} = 1,0$  (6  
litros/h). Después de lavar, se pasa metanol acuoso al 5% a  
30  $5^\circ\text{C}$  a  $\text{VE} = 1,0$  (6 litros/h), recogándose el eluato en frac

1 ciones de 1,2 litros. Las fracciones se ensayan por CCD. Se  
encuentra que la D-CPC sale en primer lugar, seguida por la  
DA-CPC. Después que se ha eluido completamente la DA-CPC,  
se pasa ulteriormente metanol acuoso al 20% a VE = 1,0 (6  
5 litros/h), con lo que sale finalmente la CPC. Las fraccio-  
nes ricas en D-CPC (fracciones núms. 6-10) se combinan, se  
neutralizan con NaOH, se concentran y se cristalizan para  
obtener un total de 35 mg de sal D-CPC.Na. Después de ello,  
las fracciones núms. 11-17 que son ricas en DA-CPC se combi  
10 nan, se neutralizan con NaOH, se concentran, cristalizan y  
secan, con lo que se obtienen 380 mg de sal DA-CPC.Na. Las  
fracciones núms. 22-40, que son ricas en CPC, se combinan,  
neutralizan con NaOH, concentran y cristalizan para recupe-  
rar 130 mg de sal CPC.Na.

#### 15 Ejemplo 12

Un matraz de Sakaguchi de 2 litros se llena con 500  
ml de un medio constituido por 5% de sacarosa, 1% de harina  
de semilla de algodón, 3% de licor de maceración de maíz y  
0,15% de  $\text{CaCO}_3$  y, después de esterilización, se inocula con  
20 Anixiepsis peruviana BS-301.67. El matraz inoculado se incu-  
ba en un aparato de sacudidas alternativas a 28°C durante 4  
días. Por otra parte, un depósito de fermentación de 50 li-  
tros de acero inoxidable se carga con 30 litros de un medio  
constituido por 8% de glucosa, 2% de harina de semilla de  
25 algodón, 1% de harina de soja bruta, 1% de licor de macera-  
ción de maíz, 0,5% de DL-metionina y 1% de  $\text{CaCO}_3$ , se esteri-  
liza de la manera rutinaria y se enfría. Este medio del de-  
pósito se inocula asépticamente con el precultivo obtenido  
arriba y se lleva a cabo la fermentación bajo agitación  
30 y aireación a 28°C (aireación, 100%; agitación 280 r.p.m.).

1 Después de 184 horas de incubación, se separa el caldo de cultivo y se elimina la materia sólida, con lo que se obtienen 25 litros de filtrado. El filtrado contiene 30  $\gamma$ /ml de CPC, 110  $\gamma$ /ml de D-CPC y 415  $\gamma$ /ml de DA-CPC.

5 Se añade a este filtrado penicilinasas (Schwarz-Mann Co., Ltd.) para descomponer completamente la cefalosporina N, y después de ajustar a pH 4,0 con ácido sulfúrico diluido, se separa por filtración la materia insoluble. El filtrado se enfría a 5°C y se cromatografía en una columna  
10 (10 cm de diámetro x 64 cm de altura) de 5 litros de carbono activado de grado cromatográfico suspendido previamente en agua. La columna se lava con agua fría y, después, se realiza la elución con acetona acuosa al 40%. El producto eluido (15 litros, pH 5,0) se pasa ulteriormente a través  
15 de una columna de 2 litros de Amberlite IRA-402 (forma acetato), con lo que se adsorben la CPC, la D-CPC y la DA-CPC. Después de lavar, se lleva a cabo la elución con 10 litros de tampón de acetato de sodio 0,2 M (pH 7,0 5°C) a VE = 1,0 (2 litros/h).

20 Este eluato se cromatografía en una columna (6 cm de diámetro x 208 cm de altura) de 6 litros de carbono activado de calidad cromatográfica suspendido previamente en agua a VE = 1,0 (6 litros/h) y, después de ello, la columna se lava con 8 litros de agua fría. Después de este lavado, se  
25 pasa alcohol isopropílico al 1% (5°C) a VE = 1,0, recogándose el eluato en fracciones de 1,2 litros. Tal como se comprueba por un ensayo de CCD de las fracciones, sale primeramente D-CPC, saliendo a continuación DA-CPC. Después que se ha eluido completamente la DA-CPC, se pasa alcohol isopropílico acuoso al 5% (5°C) a VE = 1,0, con lo que sale CPC.

30

16109

1 Las fracciones ricas en D-CFC, esto es, las fracciones núms.  
5-10, se combinan, se ajusta a pH 6,5 con NaOH, se concen-  
tran y se cristalizan, con lo que se obtienen 200 mg de sal  
D-CFC.Na. Después de ello, las fracciones ricas en DA-CFC,  
5 es decir, las fracciones núms. 11-19, se combinan, se ajustan  
a pH 6,5 con NaOH, se concentran y se cristalizan para  
recuperar la sal DA-CFC. Las fracciones ricas en CPC, es de  
cir, las fracciones núms. 24-43, se combinan, se ajustan a  
pH 6,5 con NaOH, se concentran y se cristalizan, con lo que  
10 se obtienen 40 mg de sal CPC.Na.

#### Ejemplo 13

Por el procedimiento descrito en el ejemplo 7, se  
cultiva Cephalosporium acremonium K-121 (ATCC 20427) duran-  
te 96 horas. Después de ello, se separa el caldo de fermenta-  
15 ción y se elimina la materia sólida para recuperar 25 li-  
tros de filtrado. Este filtrado contiene 4.500  $\gamma$ /ml de CPC.  
Se añade a este filtrado la D-CFC preparada por el método  
descrito en la patente de EE.UU. 3.926.729 a una concentra-  
ción de 5.000  $\gamma$ /ml, seguido por la adición de la DA-CFC pre-  
20 parada por hidrogenación catalítica de CPC a una concentra-  
ción de 5.000  $\gamma$ /ml.

El filtrado anterior (25 litros) que contiene  
4.500  $\gamma$ /ml de CPC, 5.000  $\gamma$ /ml de D-CFC y 5.000  $\gamma$ /ml de  
DA-CFC se enfría a 5°C y se hace pasar en serie a través de  
25 una columna de 3,6 litros de Amberlite IRC-50 (forma H<sup>+</sup>) y  
una columna de 22 litros de Amberlite IRA-402 (forma aceta-  
to) al caudal de 22 litros/h. Las columnas se lavan luego  
con 88 litros de agua fría en serie. Después de ello, se ha-  
ce pasar tampón de acetato de sodio (pH 7,0 0,2 M) a 5°C a  
través de la columna de Amberlite IRA-402 a 22 litros/h pa-  
30

1 ra recuperar 110 litros de eluato (pH 7,0). Este eluato se  
hace pasar a través de una columna (10 cm de diámetro x 343  
cm de altura) de carbono activado de calidad cromatográfica  
suspendido previamente en agua, a un caudal de 27 litros/h,  
5 con lo que se adsorben la CPC, la D-CPC y la DA-CPC. La co-  
luna se lava con 27 litros de agua fría, seguido por el pa-  
so de 40 litros de agua fría (5°C) al caudal de 27 litros/h,  
recogiéndose el producto eluido en fracciones de 2,7 litros.  
El ensayo por CCD del eluato demuestra que primeramente sa-  
10 le la D-CPC de la columna. Seguidamente, se pasa metanol  
acuoso al 5% a través de la columna, con lo que se eluye la  
DA-CPC. Después de la elución completa de la DA-CPC, se pa-  
sa adicionalmente metanol acuoso al 20% a través de la colum-  
na a 27 litros/h, con lo que se recupera la CPC.

15 Las fracciones núms. 5-25, que son ricas en D-CPC,  
se combinan, se ajustan a pH 6,5 con NaOH, se concentran y  
se cristalizan para recuperar 50 g de sal D-CPC.Na. Después  
de ello, las fracciones núms. 26-43, que son ricas en  
DA-CPC, se combinan, se ajustan a pH 6,5 con NaOH, se con-  
20 centran y se cristalizan para recuperar 45 g de sal DA-  
-CPC.Na. Finalmente, las fracciones núms. 47-75, que son ri-  
cas en CPC, se combinan, se ajustan a pH 6,5 con NaOH, se  
concentran y se cristalizan para obtener 30 g de sal CPC.Na.

25

16109

1

REIVINDICACIONES

5

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:

10

1ª.- Un método para separar entre sí desacetilcefalosporina C, desacetoxi-cefalosporina C y cefalosporina C, caracterizado por poner en contacto una solución acuosa bruta que contiene al menos dos miembros de entre cefalosporina C, desacetilcefalosporina C y desacetoxi-cefalosporina C con carbono activado para adsorber los compuestos de cefalosporina sobre el carbono y eluirlos fraccionadamente con agua que contiene 0 a 20 por ciento (vol/vol) de un disolvente orgánico.

15

20

2ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que la solución acuosa bruta contiene desacetilcefalosporina C.

25

3ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que la elución se realiza solamente con agua.

4ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que el disolvente orgánico es un alcohol, éter, cetona o éster.

30

5ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 4ª, en el que el alcohol es un alcohol de 1 a 6 átomos de carbono.

16109

6ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 5ª, en el que el alcohol de 1 a 6 átomos de carbono es meta

no1.

7ª.- Un método para separar entre sí desacetilcefalosporina C, desacetoxi-cefalosporina C y cefalosporina C.


Tal y como se ha descrito en la memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado.

Esta memoria consta de veintiséis hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 22.OCT.1979

P.A.

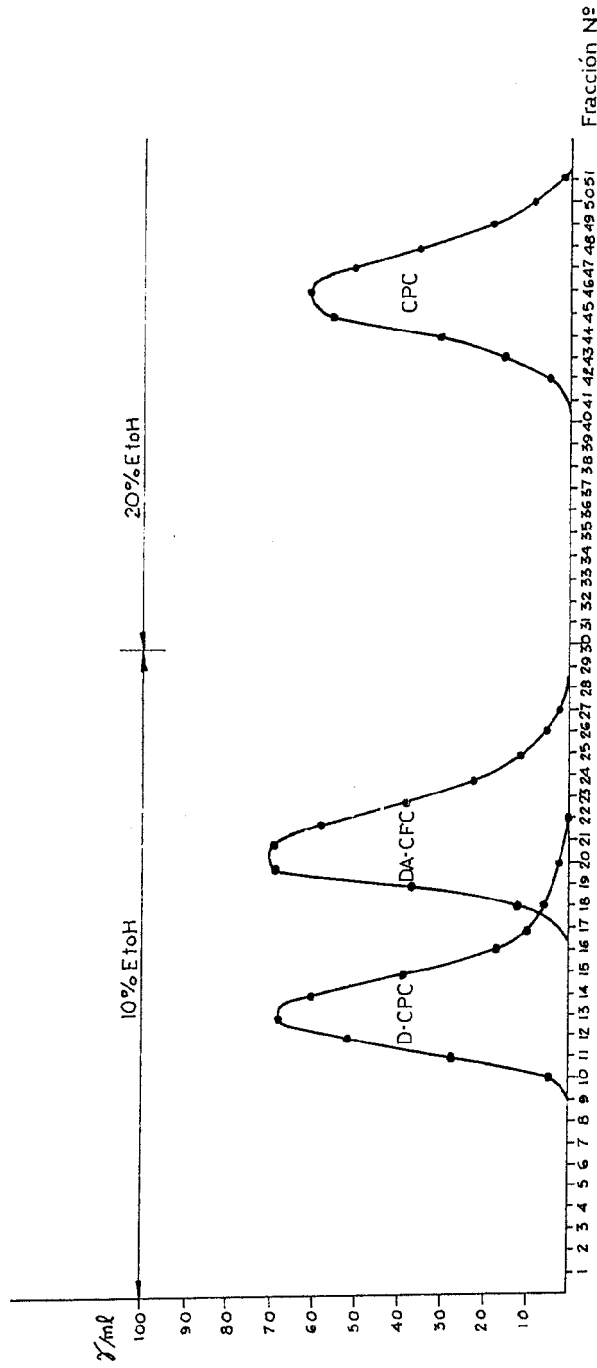
Alberto de Elzaburu  
Por Poder



16109

F C M

FIG-1



Alberto de Elcaba  
Por Product

FIG.-1

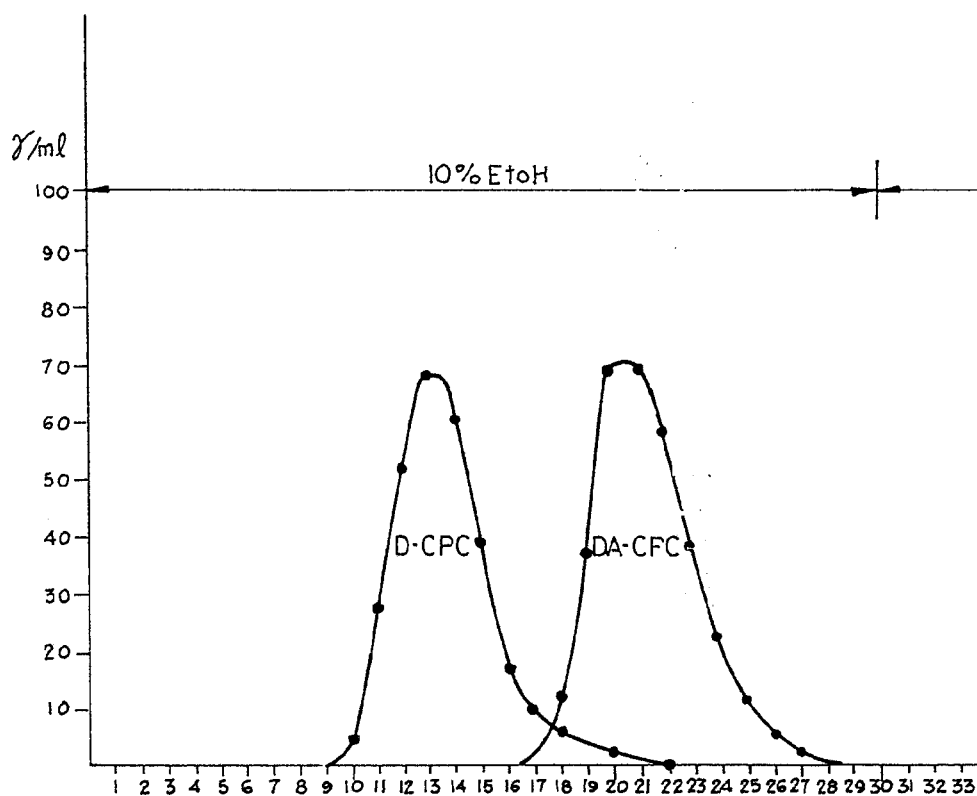
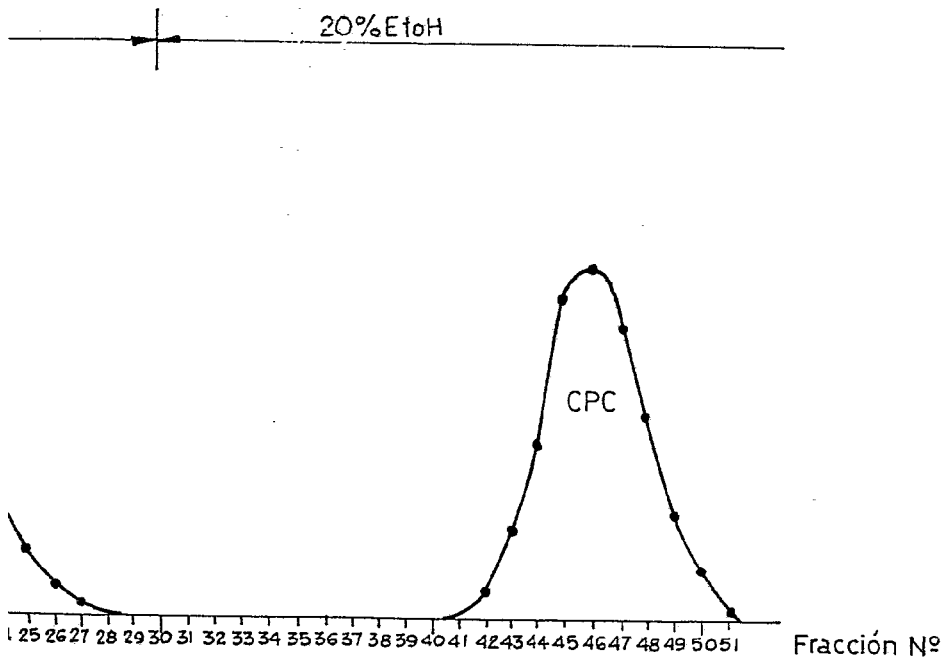


FIG.-1



Alberto de Elizaburu  
Por Poder