



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 831**

51 Int. Cl.:  
**C12P 35/04** (2006.01)  
**C12P 35/06** (2006.01)  
**C12P 37/04** (2006.01)  
**C07C 229/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08717556 .8**  
96 Fecha de presentación : **10.03.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2121960**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: **Proceso para preparar compuestos beta-lactámicos.**

30 Prioridad: **09.03.2007 EP 07103850**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.10.2011**

73 Titular/es: **DSM IP ASSETS B.V.**  
**Het Overloon 1**  
**6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es: **Van der Does, Thomas;**  
**Moody, Harold, Monro y**  
**Van Dooren, Theodorus, Johannes, Godfried,**  
**Maria**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 365 831 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Proceso para preparar compuestos beta-lactámicos

5 La presente invención se refiere a un proceso para preparar compuestos  $\beta$ -lactámicos semisintéticos mediante acilación enzimática de la amino- $\beta$ -lactama de partida con un agente acilante.

La producción enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactámicos semisintéticos mediante acilación del resto de amino- $\beta$ -lactama de partida con un derivado de ácido de cadena lateral, tal como una amida o un éster, se ha descrito en numerosas ocasiones en la bibliografía de patentes, por ejemplo, EP-A-339751, EP-A-473008, WO92/01061, WO93/12250, WO96/02663, WO96/05318, WO96/23796, WO97/04086, WO98/56946, WO99/20786, WO2005/00367, WO2006/069984, US 3.816.253 y los documentos de patentes alemanas 2163792 y 2621618. En la mayoría de los casos, las enzimas utilizadas en la técnica son penicilina acilasas obtenidas a partir de *Escherichia coli* y se inmovilizan sobre varios tipos de materiales insolubles en agua (por ejemplo, WO97/04086).

15 La desventaja principal de los procesos anteriores de la técnica es que los ésteres de cadena lateral se deben aislar en forma sólida para poder purificar dichos ésteres de cadena lateral, por ejemplo, para reducir la cantidad de cadena lateral libre en el éster. Se ha descubierto que, en el caso particular de las cadenas laterales más hidrofóbicas, tales como la D-fenilglicina y la D-dihidrofenilglicina, la presencia de cadena lateral libre en la reacción enzimática de acoplamiento posterior tiene un efecto muy negativo en el rendimiento de la reacción enzimática de acoplamiento. Esto se atribuye al hecho de que, debido a la escasa solubilidad de las cadenas laterales libres en las condiciones de la reacción enzimática de acoplamiento, existe un límite superior de la concentración de cadena lateral libre en la reacción enzimática de acoplamiento. Este límite viene determinado por la condición de que la cadena lateral libre no debe cristalizar ni precipitar, ya que el precipitado afecta negativamente a la procesabilidad de la reacción enzimática de acoplamiento. Además, en los pasos finales del procesado posterior del compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético, se debe eliminar la cadena lateral libre contaminante, por ejemplo, con las aguas madres de un paso de cristalización final del compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético. Cuanto más elevados sean los niveles de cadena lateral libre, mayor será la cantidad de aguas madres necesaria para eliminar la cadena lateral libre, la cual, a su vez, es responsable de pérdidas mayores del compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético. La operación de la unidad que lleva a cabo el aislamiento del éster de cadena lateral en forma sólida complica el proceso de producción del antibiótico semisintético y contribuye significativamente al precio de coste de este.

Por lo tanto, se necesita urgentemente un proceso de producción en el cual el éster de cadena lateral formado durante la reacción de esterificación se pueda utilizar en la reacción enzimática de acoplamiento posterior sin necesidad de aislarlo en forma sólida.

En los Ejemplos 1, 3 y 4 del documento WO98/04732 se describe la síntesis de Cefprozilo, Cefadroxilo y Amoxicilina a partir de 7-PACA, 7-ADCA y 6-APA, respectivamente, con el 2-hidroxiéster de la D-4-hidroxfenilglicina, donde, tras la síntesis del éster, este se añade directamente a la reacción enzimática de acoplamiento posterior siendo aislado en forma sólida. La D-4-hidroxfenilglicina es muy soluble en las condiciones de la reacción enzimática de acoplamiento y, por lo tanto, no genera los problemas que se dan en el caso de la D-fenilglicina y la D-dihidrofenilglicina durante la reacción enzimática de acoplamiento. Para evitar que precipiten, estas deben estar presentes solamente en concentraciones muy bajas debido a su escasa solubilidad.

45 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso de producción de derivados  $\beta$ -lactámicos de la D-fenilglicina y la D-dihidrofenilglicina, tales como Ampicilina, Cefalexina, Cefaclor y Cefradina, donde la síntesis del éster de cadena lateral se caracteriza por tener un rendimiento elevado y el éster de cadena lateral resultante contiene solamente una concentración pequeña de cadenas laterales libres y donde se omite el aislamiento del éster de cadena lateral en forma sólida para purificar dicho éster de cadena lateral.

50 En la presente, se define el "núcleo" como el resto  $\beta$ -lactámico de la  $\beta$ -lactama semisintética y puede ser cualquier penem o cefem, por ejemplo, ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA), ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) o 7-amino-3-cloro-3-cefem-4-carboxilato (7-ACCA).

55 En la presente, se define la "cadena lateral" como el resto del compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético que está unido a la posición 6-amino o 7-amino del núcleo como se ha definido en la presente, por ejemplo, la D-fenilglicina en Ampicilina, Cefalexina, Cefaclor o la D-dihidrofenilglicina en Cefradina.

60 La "cadena lateral libre" es la forma no derivatizada de la cadena lateral, por ejemplo, la D-fenilglicina o la D-dihidrofenilglicina.

El "éster de cadena lateral" es la forma de tipo éster de la cadena lateral libre, donde el grupo carboxilo de la cadena lateral libre está esterificado con un alcohol, por ejemplo, el éster metílico de la D-fenilglicina o el éster metílico de la D-dihidrofenilglicina. El éster de cadena lateral puede estar en forma de base libre o como una sal, por ejemplo

como la sal de HCl, y el éster de cadena lateral puede estar en forma sólida o disuelto en un disolvente adecuado.

En la presente, se define "proporción" como:

$$\frac{[\text{cantidad de éster de cadena lateral}]}{[\text{cantidad de éster de cadena lateral}] + [\text{cantidad de cadena lateral libre}]}$$

5

donde las cantidades se expresan en moles.

En un aspecto, la invención proporciona un proceso para sintetizar un compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético a partir de un núcleo y una cadena lateral seleccionada del grupo que consiste en D-fenilglicina y D-dihidrofénilglicina en forma de un éster de cadena lateral y una enzima que cataliza el acoplamiento entre el éster de cadena lateral y el núcleo, que se caracteriza por que el proceso comprende la formación del éster de cadena lateral de la cadena lateral, donde dicho éster de cadena lateral no se aísla como un intermedio sólido. El proceso puede comprender, por ejemplo, los pasos siguientes:

- 10
- 15
- 20
- a) convertir una cadena lateral libre seleccionada del grupo que consiste en D-fenilglicina y D-dihidrofénilglicina, por reacción con un alcohol, para formar una mezcla que comprende el éster de cadena lateral correspondiente; la formación del éster de cadena lateral en este paso preferentemente proporciona una mezcla con una conversión que se expresa mediante la "proporción" como se ha definido anteriormente en la presente y donde la proporción es preferentemente  $\geq 85\%$ , más preferentemente  $\geq 90\%$ , más preferentemente  $\geq 95\%$ , más preferentemente  $\geq 96\%$ , más preferentemente  $\geq 97\%$ , más preferentemente  $\geq 98\%$ , aún más preferentemente  $\geq 99\%$ ;
  - b) formar el compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético mezclando la mezcla obtenida en el paso (a) con un núcleo y la enzima para formar el compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético, con la condición de que el éster de cadena lateral formado en el paso (a) no se aisle como un intermedio sólido.

25

30

El núcleo utilizado en el proceso de la presente invención y como se ha definido en la presente anteriormente, se puede seleccionar del grupo que consiste en ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA), ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) y 7-amino-3-cloro-3-cefem-4-carboxilato (7-ACCA), de manera que proporcione penicilinas semisintéticas (derivadas de 6-APA) y cefalosporinas semisintéticas (derivadas de 7-ADCA, 7-ACA y 7-ACCA), respectivamente. Una realización preferida de la presente invención es el proceso para preparar un compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético seleccionado del grupo que consiste en Ampicilina, Cefalexina, Cefradina y Cefaclor.

35

En el paso de conversión (paso (a)) del proceso de la invención, se convierte una cadena lateral libre seleccionada del grupo que consiste en D-fenilglicina y D-dihidrofénilglicina, por reacción con un alcohol, para formar una mezcla que comprende el éster de cadena lateral correspondiente. El alcohol utilizado en el proceso de la invención se puede seleccionar del grupo que consiste en metanol y etanol, y de esta manera se forman el éster metílico y el éster etílico de la cadena lateral, respectivamente. El alcohol más preferido es el metanol. El paso (a) se puede llevar a cabo de diferentes maneras.

40

45

Una realización del paso de conversión (a) comprende calentar una mezcla que comprende una cadena lateral libre seleccionada del grupo que consiste en D-fenilglicina y D-dihidrofénilglicina, un alcohol seleccionado en función del éster que se desea formar, por ejemplo metanol para obtener el éster metílico o etanol para obtener el éster etílico, y un ácido fuerte tal como el ácido sulfúrico, a reflujo a una temperatura que oscila entre 20 y 120 °C, más preferentemente entre 40 y 100 °C. Cuando se utiliza metanol como alcohol, la temperatura oscila preferentemente entre 60 y 80 °C. Cuando se utiliza etanol como alcohol, la temperatura oscila preferentemente entre 65 y 100 °C. Para consultar algunas condiciones adecuadas, remítase a los ejemplos comparativos 1 y 2 descritos en EP-A-0544205.

50

Otra realización del paso de conversión (a) comprende una mejora de la realización anterior y comprende la adición del alcohol a la mezcla de reacción como un líquido o un gas, a la vez que el alcohol y el agua se separan de la reacción mediante destilación (por ejemplo, como se describe en EP-A-0544205).

Una realización muy preferida del paso de conversión (a), la cual proporciona una mezcla que comprende el éster metílico de la cadena lateral, comprende los pasos siguientes:

- 55
- 60
1. calentar a reflujo una mezcla de reacción que comprende una cadena lateral libre seleccionada del grupo que consiste en D-fenilglicina y D-dihidrofénilglicina, metanol y un ácido fuerte, tal como el ácido sulfúrico, durante un cierto tiempo, por ejemplo, entre 0.5 y 5 horas, preferentemente entre 1 hora y 3 horas, más preferentemente entre 1.5 y 2.5 horas, a una temperatura que oscila entre 20 y 120 °C, más preferentemente entre 20 y 100 °C, más preferentemente de entre 40 y 100 °C, aún más preferentemente entre 60 y 80 °C; y a continuación
  2. concentrar la mezcla a una temperatura de entre 40 y 100 °C, preferentemente de entre 60 y 90 °C, más preferentemente de entre 70 y 80 °C. La presión durante este paso puede ser inicialmente atmosférica y se puede reducir durante el paso de concentración hasta una presión preferentemente menor o igual a 50 mbar, más preferentemente menor o igual a 40 mbar, más preferentemente menor o igual a 30 mbar y aún más

preferentemente menor o igual a 20 mbar. El paso de concentración se lleva a cabo hasta que se elimina más del 30% del agua presente antes del paso de concentración, preferentemente se elimina más del 40% del agua, preferentemente se elimina más del 50% del agua, preferentemente se elimina más del 70% del agua, preferentemente se elimina más del 80% del agua y aún más preferentemente se elimina más del 90% del agua.

- 5 3. añadir metanol, preferentemente una cantidad tal que se obtenga el volumen inicial de la mezcla de reacción antes del paso de concentración o una cantidad menor que el volumen inicial de la mezcla de reacción, por ejemplo,  $\leq 90\%$  o  $\leq 80\%$  o  $\leq 70\%$  o  $\leq 60\%$  o  $\leq 50\%$  o  $\leq 40\%$  o  $\leq 30\%$  o  $\leq 20\%$  del volumen inicial de la mezcla de reacción. La cantidad añadida de metanol también puede ser superior al volumen inicial de la mezcla de reacción.
- 10 4. opcionalmente repetir los pasos 1-3 una o más veces, preferentemente al menos una vez, preferentemente 2 veces, más preferentemente 3 veces, más preferentemente 4 veces, más preferentemente 5 veces, más preferentemente 6 veces, más preferentemente 7 veces, más preferentemente 8 veces, más preferentemente 9 veces, más preferentemente 10 veces. Se ha descubierto que al repetir estos pasos la "proporción", como se ha definido anteriormente en la presente, de la formación del éster metílico aumenta significativamente. Por ejemplo, tras llevar a cabo los pasos (a)-(c) solo una vez, se puede obtener una "proporción" de entre el 75-85%, tras repetir los pasos (a)-(c) una vez, se puede obtener una "proporción" de entre el 85-95%, tras repetir los pasos (a)-(c) 2 veces, se puede obtener una "proporción" de entre el 95-97%, tras repetir los pasos (a)-(c) 3 veces, se puede obtener una "proporción" de entre el 97-98%, tras repetir los pasos (a)-(c) 4 veces, se puede obtener una "proporción" de entre el 98-99%, tras repetir los pasos (a)-(c) 5 veces, se puede obtener una "proporción" de entre el 99-99.5% y tras repetir los pasos (a)-(c) más de 5 veces, se puede obtener una "proporción" por encima del 99.5%.

Otra realización muy preferida del paso de conversión (a), la cual proporciona una mezcla que comprende el éster etílico de la cadena lateral, comprende los pasos siguientes:

- 25 1. calentar a reflujó una mezcla de reacción que comprende una cadena lateral libre seleccionada del grupo que consiste en D-fenilglicina y D-dihidrofénilglicina, etanol y un ácido fuerte, tal como el ácido sulfúrico, durante un cierto tiempo, por ejemplo, entre 0.5 y 5 horas, preferentemente entre 1 hora y 3 horas, más preferentemente entre 1.5 y 2.5 horas, a una temperatura que oscila entre 20 y 120 °C, más preferentemente entre 20 y 100 °C, más preferentemente entre 40 y 100 °C, aún más preferentemente entre 65 y 100 °C; y a continuación
- 30 2. concentrar la mezcla a una temperatura entre 40 y 100 °C, preferentemente entre 60 y 90 °C, más preferentemente entre 70 y 80 °C. La presión durante este paso puede ser inicialmente atmosférica y se puede reducir durante el paso de concentración hasta una presión preferentemente menor o igual a 50 mbar, más preferentemente menor o igual a 40 mbar, más preferentemente menor o igual a 30 mbar y aún más preferentemente menor o igual a 20 mbar. El paso de concentración se lleva a cabo hasta que se elimina más del 30% del agua presente antes del paso de concentración, preferentemente se elimina más del 40% del agua, preferentemente se elimina más del 50% del agua, preferentemente se elimina más del 70% del agua, preferentemente se elimina más del 80% del agua y aún más preferentemente se elimina más del 90% del agua.
- 35 3. añadir etanol, preferentemente una cantidad tal que se obtenga el volumen inicial de la mezcla de reacción antes del paso de concentración o una cantidad menor que el volumen inicial de la mezcla de reacción, por ejemplo,  $\leq 90\%$  o  $\leq 80\%$  o  $\leq 70\%$  o  $\leq 60\%$  o  $\leq 50\%$  o  $\leq 40\%$  o  $\leq 30\%$  o  $\leq 20\%$  del volumen inicial de la mezcla de reacción. La cantidad añadida de etanol también puede ser superior al volumen inicial de la mezcla de reacción.
- 40 4. opcionalmente repetir los pasos 1-3 una o más veces, preferentemente al menos una vez, preferentemente 2 veces, más preferentemente 3 veces, más preferentemente 4 veces, más preferentemente 5 veces, más preferentemente 6 veces, más preferentemente 7 veces, más preferentemente 8 veces, más preferentemente 9 veces, más preferentemente 10 veces. Se ha descubierto que al repetir estos pasos la "proporción", como se ha definido anteriormente en la presente, de la formación del éster etílico aumenta significativamente. Por ejemplo, tras llevar a cabo los pasos (a)-(c) solo una vez, se puede obtener una "proporción" de entre el 75-85%, tras repetir los pasos (a)-(c) una vez, se puede obtener una "proporción" de entre el 85-95%, tras repetir los pasos (a)-(c) 2 veces, se puede obtener una "proporción" de entre el 95-97%, tras repetir los pasos (a)-(c) 3 veces, se puede obtener una "proporción" de entre el 97-98%, tras repetir los pasos (a)-(c) 4 veces, se puede obtener una "proporción" de entre el 98-99%, tras repetir los pasos (a)-(c) 5 veces, se puede obtener una "proporción" de entre el 99-99.5% y tras repetir los pasos (a)-(c) más de 5 veces, se puede obtener una "proporción" por encima del 99.5%.

55 En todas las realizaciones del paso (a), se utiliza preferentemente la siguiente relación molar del alcohol frente a la cadena lateral libre: entre 3 y 25, más preferentemente entre 5 y 25 y aún más preferentemente entre 6 y 10. Además, en todas las realizaciones del paso (a), se utiliza preferentemente la siguiente relación molar del ácido fuerte (en equivalentes, por ejemplo, un mol de ácido clorhídrico es un equivalente y un mol de ácido sulfúrico son dos equivalentes) frente a la cadena lateral libre: entre 0.9 y 10, más preferentemente entre 1 y 5 y aún más preferentemente entre 2 y 3. Un experto podrá optimizar las condiciones de reacción dependiendo de la cadena lateral y del alcohol seleccionados sin necesidad de llevar a cabo demasiados experimentos.

60 Antes de formar el compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético en el paso (b), la mezcla obtenida en el paso (a) se puede

purificar para obtener una mezcla con una "proporción" elevada según se ha definido anteriormente en la presente. La proporción de la mezcla que se va a utilizar en el paso (b) del proceso de la invención es preferentemente  $\geq 85\%$ , más preferentemente  $\geq 90\%$ , más preferentemente  $\geq 95\%$ , más preferentemente  $\geq 96\%$ , más preferentemente  $\geq 97\%$ , más preferentemente  $\geq 98\%$ , aún más preferentemente  $\geq 99\%$ .

Una realización del paso de purificación implica precipitar y eliminar la cadena lateral libre del éster de cadena lateral. Esto se puede lograr ajustando el pH de la mezcla obtenida en el paso (a) hasta un valor de entre 2 y 6.5, preferentemente entre 2.5 y 5, aún más preferentemente entre 3 y 4, mediante la adición de una base adecuada, tal como NaOH, amoníaco, KOH. En otra realización, se puede añadir la mezcla de reacción obtenida en el paso (a) a una cantidad adecuada de agua o a un alcohol o a una mezcla de agua y alcohol, y a continuación ajustar el pH hasta un valor de entre 2 y 6.5, preferentemente de entre 2.5 y 5, aún más preferentemente de entre 3 y 4, mediante la adición de una base adecuada, tal como NaOH, amoníaco, KOH. Tras ajustar el pH al valor deseado, se puede mantener el pH en el valor deseado mediante la adición de la base adecuada. En estas condiciones, se puede formar un precipitado que comprende la cadena lateral libre. Tras transcurrir un tiempo adecuado, se puede separar el precipitado mediante filtración utilizando técnicas conocidas. El filtrado comprende el éster de cadena lateral. Para poder utilizar el filtrado directamente en el paso (b) del proceso de la invención, el pH del filtrado se debe ajustar a un pH de entre 1 y 6, preferentemente de entre 1 y 4, aún más preferentemente de entre 1.5 y 3, y a continuación el alcohol se elimina por evaporación utilizando técnicas conocidas.

Otra realización del paso de purificación implica la formación de un sistema bi- o multifásico que comprende una fase orgánica que contiene el derivado de tipo éster de cadena lateral y una cantidad minoritaria de cadena lateral libre, y una fase acuosa que contiene la cadena lateral libre y opcionalmente sal. Esto se puede lograr ajustando el pH de la mezcla obtenida en el paso (a) a un valor de entre 7.5 y 10, preferentemente de entre 8.5 y 9.5, aún más preferentemente de entre 8.8 y 9.2, mediante la adición de una base adecuada tal como NaOH, amoníaco, KOH. En otra realización, se puede añadir la mezcla de reacción obtenida en el paso (a) a una cantidad adecuada de agua, de un alcohol o a una mezcla de agua y alcohol, y a continuación ajustar el pH a un valor de entre 7.5 y 10, preferentemente de entre 8.5 y 9.5, aún más preferentemente de entre 8.8 y 9.2, mediante la adición de una base adecuada, tal como NaOH, amoníaco, KOH. Tras ajustar el pH al valor deseado, se puede mantener el pH en el valor deseado mediante la adición de la base adecuada. Opcionalmente, el agua puede estar en forma de una solución salina acuosa (por ejemplo, de NaCl). La cadena lateral libre también puede formar un precipitado. Se pueden separar las distintas fases del sistema multifásico utilizando técnicas conocidas. Opcionalmente, se puede lavar la fase orgánica con agua o una solución salina acuosa. La fase acuosa del lavado se puede reciclar en un circuito del proceso adecuado para evitar pérdidas de rendimiento. Este circuito del proceso puede ser la mezcla de reacción obtenida después del paso (a) o después del ajuste de pH como se ha descrito.

Una realización muy preferida del paso de purificación combina las dos realizaciones anteriores, es decir, en primer lugar se ajusta el pH de la mezcla obtenida en el paso (a) a un valor de entre 2 y 6.5, preferentemente de entre 2.5 y 5, aún más preferentemente de entre 3 y 4, se separa el precipitado formado mediante filtración, posteriormente se ajusta el pH del filtrado obtenido a un pH de entre 7.5 y 10, preferentemente de entre 8.5 y 9.5, aún más preferentemente de entre 8.8 y 9.2, y se separan las distintas fases del sistema multifásico obtenido utilizando técnicas conocidas.

Sorprendentemente, se ha descubierto que las dos realizaciones anteriores donde el sistema multifásico se forma a un pH de entre 7.5 y 10, preferentemente de entre 8.5 y 9.5, aún más preferentemente de entre 8.8 y 9.2, pueden proporcionar un éster, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en el éster metílico de la D-fenilglicina, el éster etílico de la D-fenilglicina, el éster metílico de la D-dihidrofénilglicina y el éster etílico de la D-dihidrofénilglicina, en forma de base libre, donde el éster tiene las propiedades siguientes:

- un e.e. (exceso enantiomérico) preferentemente mayor o igual al 90%, más preferentemente mayor o igual al 95%, preferentemente mayor o igual al 96%, preferentemente mayor o igual al 97%, preferentemente mayor o igual al 98% y aún más preferentemente mayor o igual al 99%; y
- un contenido salino preferentemente menor o igual al 20% mol, más preferentemente menor o igual al 10% mol, más preferentemente menor o igual al 5% mol, más preferentemente menor o igual al 2% mol, aún más preferentemente menor o igual al 1% mol, expresado en moles de sal en función de moles de éster;
- una "proporción", como se ha definido anteriormente en la presente, preferentemente  $\geq 85\%$ , más preferentemente  $\geq 90\%$ , más preferentemente  $\geq 95\%$ , más preferentemente  $\geq 96\%$ , más preferentemente  $\geq 97\%$ , más preferentemente  $\geq 98\%$ , aún más preferentemente  $\geq 99\%$ .

En el paso (b) del proceso de la invención, el compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético se forma mezclando la mezcla obtenida en el paso (a), opcionalmente purificada como se ha descrito anteriormente en la presente, con un núcleo y una enzima adecuada, preferentemente una enzima inmovilizada, para formar el compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético correspondiente, con la condición de que el éster de cadena lateral formado en el paso (a) y opcionalmente purificado no se aisle como un intermedio sólido. El paso (b) se puede llevar a cabo de acuerdo con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica, los cuales se han citado anteriormente en la presente. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la síntesis de Ampicilina según se describe en EP-A-339751 o WO98/56946.

Asimismo, se puede llevar a cabo la síntesis de Cefalexina según se describe en WO96/23796. Se puede llevar a cabo la síntesis de Cefradina según se describe en WO2005/003367 y se puede llevar a cabo la síntesis de Cefaclor según se describe en WO2006/069984.

5 Tras el acoplamiento enzimático, el antibiótico  $\beta$ -lactámico semisintético se puede recuperar utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, se puede vaciar el reactor enzimático por el tamiz inferior utilizando agitación ascendente. A continuación, se puede filtrar la suspensión resultante del antibiótico  $\beta$ -lactámico semisintético a través de un filtro de vidrio.

10 Debido a las pequeñas cantidades de cadena lateral libre presentes después de la reacción enzimática de acoplamiento, se puede llevar a cabo la cristalización del antibiótico  $\beta$ -lactámico semisintético final con concentraciones elevadas del antibiótico  $\beta$ -lactámico semisintético, lo que proporciona rendimientos elevados.

15 En un segundo aspecto, el método descrito en la presente proporciona un éster, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en el éster metílico de la D-fenilglicina, el éster etílico de la D-fenilglicina, el éster metílico de la D-dihidrofenilglicina y el éster etílico de la D-dihidrofenilglicina, en forma de base libre, donde el éster tiene las propiedades siguientes:

- un e.e. (exceso enantiomérico) preferentemente mayor o igual al 90%, más preferentemente mayor o igual al 95%, preferentemente mayor o igual al 96%, preferentemente mayor o igual al 97%, preferentemente mayor o igual al 98% y aún más preferentemente mayor o igual al 99%; y
- un contenido salino preferentemente menor o igual al 20 % mol, más preferentemente menor o igual al 10 % mol, más preferentemente menor o igual al 5 % mol, más preferentemente menor o igual al 2 % mol, aún más preferentemente menor o igual al 1 % mol, expresado en moles de sal en función de moles de éster;
- una "proporción", como se ha definido anteriormente en la presente, preferentemente,  $\geq 85\%$ , más preferentemente  $\geq 90\%$ , más preferentemente  $\geq 95\%$ , más preferentemente  $\geq 96\%$ , más preferentemente  $\geq 97\%$ , más preferentemente  $\geq 98\%$ , aún más preferentemente  $\geq 99\%$ .

20 Resultará evidente para los expertos que se proporciona un éster en forma de base libre con cualquier valor de e.e. enumerado, combinado con cualquier valor de contenido salino enumerado y combinado con cualquier valor de la "proporción".

25 En un tercer aspecto, la descripción proporciona un proceso para producir el éster en forma de base libre con las propiedades definidas anteriormente. El proceso puede comprender mezclar una sal del éster de cadena lateral con una base en un entorno acuoso para producir de este modo un sistema bifásico y separar el éster de cadena lateral en forma de base libre de la fase acuosa.

30 La sal del éster de cadena lateral puede ser cualquier sal adecuada tal como la sal de HCl. La sal puede estar en forma sólida o puede estar en forma líquida, es decir, en una solución de agua o de cualquier otro disolvente adecuado, que contenga opcionalmente otros componentes tales como sales. La base que está mezclada con la sal del éster de cadena lateral puede ser cualquier base, preferentemente una base fuerte, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoniaco.

35 En el sistema bifásico formado, la fase orgánica con el éster de cadena lateral en forma de base libre preferentemente no contiene cadena lateral libre o contiene solamente niveles muy bajos de cadena lateral libre, es decir, la "proporción", según se ha definido anteriormente en la presente, es preferentemente  $\geq 85\%$ , más preferentemente  $\geq 90\%$ , más preferentemente  $\geq 95\%$ , más preferentemente  $\geq 96\%$ , más preferentemente  $\geq 97\%$ , más preferentemente  $\geq 98\%$ , aún más preferentemente  $\geq 99\%$ , mientras que la fase acuosa que contiene la cadena lateral libre y opcionalmente sales preferentemente no contiene éster de cadena lateral o contiene solamente niveles muy bajos de éster de cadena lateral.

40 El sistema bifásico se puede formar como se ha descrito anteriormente en la presente en los pasos de purificación en los que el sistema multifásico se forma a un pH de entre 7.5 y 10, preferentemente de entre 8.5 y 9.5, aún más preferentemente de entre 8.8 y 9.2.

45 Las distintas fases del sistema multifásico se pueden separar utilizando técnicas conocidas. Algunos métodos adecuados son los que se basan en la diferencia entre las densidades de las distintas fases. Dependiendo de la escala, la separación se puede conseguir utilizando la gravedad normal o preferentemente utilizando fuerzas centrífugas, ya sea en modo discontinuo o más preferentemente en modo continuo. En la Figura 1 y el Ejemplo 5 se describe con detalle un proceso de centrifugación continuo preferido para PGM. Este proceso se puede aplicar a cualquier éster, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en el éster metílico de la D-fenilglicina, el éster etílico de la D-fenilglicina, el éster metílico de la D-dihidrofenilglicina y el éster etílico de la D-dihidrofenilglicina, en forma de base libre.

**Figura 1**

- 5 A. Un recipiente que contiene una solución de PGM, que se puede obtener como se describe en el Ejemplo 4.
- B. Un recipiente que contiene una solución de NaOH (65 g/kg de solución) y NaCl (211 g/kg de solución) en agua (724 g/kg de solución). El contenido del recipiente se mantiene entre 3 y 5 °C.
- C. Un recipiente de vidrio de 10 L equipado con un agitador, deflector, termómetro, pHímetro, una entrada para la solución de PGM, una entrada para la solución de NaOH/NaCl y una salida para la mezcla de reacción. El recipiente se coloca en un baño refrigerante.
- 10 D. Un intercambiador de calor (con un volumen interno de 1 L) para aumentar la temperatura de la mezcla de reacción hasta 30 °C antes de introducirla en las centrifugas.
- E. Un recipiente que contiene una solución de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 25% (p/p). El contenido del recipiente se calentó hasta 30 °C.
- 15 F. Dos centrifugas de extracción Robatel BXP130 (extractores líquido/líquido, diámetro del bol de 125 mm, volumen del bol de 1.4 L, diámetro de la presa de la fase ligera de 61 mm, diámetro de la presa de la fase pesada de 66 mm). Las entradas y salidas de las centrifugas se conectaron como sigue:
- la mezcla de reacción del recipiente de 10 L se introdujo en la entrada de la fase ligera de la centrifuga 1,
  - la solución de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 25% (p/p) se introdujo en la entrada de la fase pesada de la centrifuga 2,
  - la salida pesada de la centrifuga 1 se conectó con el recipiente receptor (G). Después del experimento se
- 20 desechó el contenido,
- la salida de la fase ligera de la centrifuga 1 se conectó con la entrada de la fase ligera de la centrifuga 2,
  - la salida de la fase pesada de la centrifuga 2 se conectó con la entrada de la fase pesada de la centrifuga 1 y
  - la salida de la fase ligera de la centrifuga 2 se bombeó, mediante una bomba peristáltica, a través del intercambiador de calor para enfriar este circuito del proceso hasta 3-5 °C.
- 25 G. Un recipiente receptor para recoger la fase acuosa de la centrifuga 1.
- H. Un intercambiador de calor para enfriar el circuito del proceso hasta 3-5 °C.
- I. Un recipiente, que se mantiene enfriado a 3-5 °C, para recoger PGM en forma de base libre.

En la Figura 1 no se muestran las bombas peristálticas siguientes:

- 30 • Una bomba peristáltica para bombear la solución de PGM al recipiente de 10 L.
- Una bomba peristáltica para bombear la solución de NaOH/NaCl al recipiente de 10 L. El flujo de esta bomba se controló mediante el pHímetro.
- Una bomba peristáltica para bombear la mezcla de reacción hasta las centrifugas a través del intercambiador de calor.
- 35 • Una bomba peristáltica para bombear la solución de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 25% (p/p) hasta las centrifugas.

**Ejemplos****Ejemplo 1****a) Síntesis de una solución del éster metílico de la fenilglicina (PGM)**

Se suspendieron 90 g de D-fenilglicina en 170 mL de metanol y se añadieron 73.2 g de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se mantuvo a reflujo durante 2 horas a aproximadamente 73 °C y se concentró a presión reducida utilizando una bomba de vacío. La presión se redujo desde presión atmosférica hasta 20 mBar, al mismo tiempo que la temperatura de la mezcla de reacción aumentó desde 40 hasta 80 °C.

Se añadieron 170 mL de metanol, la mezcla se mantuvo a reflujo otra vez durante 2 horas y se concentró a presión reducida. Se volvieron a añadir 170 mL de metanol, la mezcla se mantuvo a reflujo durante 2 horas y se concentró a presión reducida. Finalmente, se añadieron 125 mL de metanol. En este punto, la "proporción", como se ha definido anteriormente en la presente, fue del 95%.

La solución se introdujo en un segundo reactor, en el que se habían introducido previamente 20 mL de metanol, durante 1 hora a 20 °C. Se mantuvo el pH a 3.5 con amoníaco. Se formó un sólido, que se eliminó mediante filtración. Las aguas madres resultantes se diluyeron con 25 mL de agua y se concentraron a presión reducida (p = 20 mmHg, T = 40-45 °C). Finalmente, se obtuvieron 207.5 g de una solución del éster metílico de la D-fenilglicina (PGM). La "proporción" de la solución resultante fue del 99%.

**b) Síntesis enzimática de Cefalexina**

60 En un reactor con un tamiz inferior de 175 µm, se introdujeron 15 g de Phe-B24-Ala mutante de la PenG acilasa de *Escherichia coli*, inmovilizado. Posteriormente, se añadieron 21.4 g de 7-ADCA y 95 g de agua a 25 °C y se ajustó el pH a 7.0 con amoníaco al 25%.

Se introdujeron 38 g de la solución de PGM obtenida en el paso a) (anterior) en el reactor a una velocidad constante durante 120 min. Se mantuvo el pH a 7.0 con amoníaco. Se mantuvo la temperatura a 25 °C. Después de 30 min, se añadieron 0.25 g de Cefalexina sólida (núcleo de cristalización). La cristalización de Cefalexina empezó a los 45 min. Desde 120 hasta 150 min, el pH se mantuvo a 7.0 con ácido sulfúrico al 25%. Posteriormente, se redujo el pH hasta 5.7 con ácido sulfúrico al 25%.

### c) *Recuperación de Cefalexina*

El reactor se vació por el tamiz inferior con agitación ascendente. La suspensión resultante de Cefalexina se filtró a través de un filtro de vidrio. Las aguas madres resultantes se volvieron a transferir al reactor. Se repitió esta secuencia de pasos cinco veces. Posteriormente, la enzima se lavó 2 x 10 mL de agua. De esta manera, se separó ≥ 98% de Cefalexina del biocatalizador sólido.

Se combinaron la Cefalexina sólida húmeda retenida en el filtro, las aguas madres y el agua del lavado, y se mantuvo la temperatura a 2 °C. Se redujo el pH del sólido húmedo retenido en el filtro combinado con las aguas madres hasta 1.5 con ácido sulfúrico concentrado y la solución resultante se filtró a través de un filtro de 0.45 µm.

En un reactor de cristalización, se introdujeron 20 g de agua y 1.0 g de Cefalexina (núcleo de cristalización). La solución ácida de Cefalexina mencionada anteriormente se introdujo en el reactor de cristalización durante 80 minutos a 30 °C. Se mantuvo el pH a 5.0 con amoníaco. Posteriormente, se agitó la suspensión a 20 °C durante 30 min más. La suspensión se filtró a través de un filtro de vidrio y el sólido húmedo retenido en el filtro se lavó 2 x 15 mL de agua y 2 x 15 mL de acetona. Después de secar, se obtuvieron 32.6 g de Cefalexina monohidratada (pureza > 99.8%).

## Ejemplo 2

### a) *Síntesis de una solución del éster metílico de la D-dihidrofenilglicina (DHPGM)*

Se suspendieron 90 g de D-dihidrofenilglicina (DHPG) en 200 mL de metanol y se añadieron 73.2 g de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se mantuvo a reflujo durante 2 horas a aproximadamente 73 °C y se concentró a presión reducida utilizando una bomba de vacío. La presión se redujo desde presión atmosférica hasta 20 mBar, al mismo tiempo que la temperatura de la mezcla de reacción aumentó desde 40 hasta 80 °C.

Se añadieron 170 mL de metanol, la mezcla se mantuvo a reflujo otra vez durante 2 horas y se concentró a presión reducida. Se volvieron a añadir 170 mL de metanol, la mezcla se mantuvo a reflujo durante 2 horas y se concentró a presión reducida. Finalmente, se añadieron 125 mL de metanol. En este punto, la "proporción", como se ha definido anteriormente en la presente, fue del 94.8%.

La solución se introdujo en un segundo reactor, en el que se habían introducido previamente 20 mL de metanol, durante 1 hora a 20 °C. Se mantuvo el pH a 3.5 con amoníaco. Se formó un sólido, que se eliminó mediante filtración. Las aguas madres resultantes se diluyeron con 25 mL de agua, se decoloraron con 3 g de carbón (carbón activo) y se concentraron a presión reducida (p = 20 mmHg, T = 40-45 °C). Finalmente, se obtuvieron 217.6 g de una solución de DHPGM. La "proporción" de la solución resultante fue del 99.2%.

### b) *Síntesis enzimática de Cefradina*

Este paso se llevó a cabo como se describe en WO2005/003367.

## Ejemplo 3

### a) *Síntesis de una solución del éster metílico de la D-fenilglicina (PGM)*

Se suspendieron 90 g de D-fenilglicina en 170 mL de metanol y se añadieron 73.2 g de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se mantuvo a reflujo durante 2 horas a aproximadamente 73 °C y se concentró a presión reducida utilizando una bomba de vacío. La presión se redujo desde presión atmosférica hasta 20 mBar, al mismo tiempo que la temperatura de la mezcla de reacción aumentó desde 40 hasta 80 °C.

Se añadieron 170 mL de metanol, la mezcla se mantuvo a reflujo otra vez durante 2 horas y se concentró a presión reducida. Se volvieron a añadir 170 mL de metanol, la mezcla se mantuvo a reflujo durante 2 horas y se concentró a presión reducida. Finalmente, se añadieron 125 mL de metanol. Esta mezcla se denomina mezcla de esterificación.

La mayor parte de la mezcla de esterificación (aproximadamente el 95%) se introdujo en un segundo reactor, en el que se habían introducido previamente 40 mL de agua, durante 1 hora a 25-30 °C. Se mantuvo el pH a 3.5 con NaOH 8 M (se consumieron 34 g). Se formó un sólido, que se eliminó mediante filtración. Las aguas madres



resultantes se mezclaron con la mezcla de esterificación (aproximadamente el 5%) para reducir el pH del filtrado hasta un pH = 2. La mezcla se concentró a presión reducida ( $p = 20$  mmHg,  $T = 40-45$  °C). Finalmente, se obtuvieron 190 g de una mezcla viscosa.

5 **b) Preparación de NaOH 2 M en NaCl 5 M**

Se disolvieron 80 g de NaOH en 149 mL de agua. La solución se diluyó hasta 1000 mL mediante la adición de NaCl 5 M. Se necesitan aproximadamente 840 mL de NaCl 5 M para ajustar el volumen a 1000 mL.

10 **c) Síntesis de PGM como base libre**

La mezcla viscosa obtenida en a) se mezcló con 120 mL de NaCl 5 M a 40 °C. Esta mezcla se añadió durante 20 minutos a 50 mL de NaCl 5 M, al mismo tiempo que se mantuvo el pH = 9 mediante la adición de NaOH 2 M en NaCl 5 M. Se mantuvo la temperatura de la mezcla a 20 °C. La mezcla se transfirió a un embudo de extracción y se dejó reposar durante 20 minutos. Posteriormente se separaron las fases. La fase superior se mezcló con 120 mL de NaCl 5 M a temperatura ambiente. La mezcla se transfirió a un embudo de extracción y se dejó reposar durante 20 minutos. Se separaron las fases. La fase superior se centrifugó a 5000 rpm. Se formó una fase inferior minoritaria, que se eliminó del producto oleoso. Se obtuvieron 95 g de PGM en forma de base libre. Análisis: 85%; e.e. = 97%; rendimiento basado en la entrada de PG en el paso (a): 82%. Análisis de PG en PGM en forma de base libre: 0.2% (es decir, una "proporción" del 99.8%).

25 **d) Síntesis de Ampicilina**

Este paso se llevó a cabo según se describe en WO98/56946 para la síntesis de Ampicilina a partir de 6-APA y PGA, es decir, el derivado de tipo amida de la PG en lugar del éster metílico.

**Ejemplo 4**

30 **Síntesis de una solución del éster metílico de la D-fenilglicina (PGM)**

Se suspendieron 135 g de D-fenilglicina en 252 mL de metanol y se añadieron 107 g de ácido sulfúrico concentrado (98%). La mezcla se mantuvo a reflujo durante 2 horas a aproximadamente 73 °C y se concentró a presión reducida utilizando una bomba de vacío. La presión se redujo desde presión atmosférica hasta 20 mBar, al mismo tiempo que la temperatura de la mezcla de reacción aumentó desde 40 hasta 80 °C. Se añadieron 126 mL (100 g) de metanol, la mezcla se mantuvo a reflujo durante 1 hora a aproximadamente 81 °C y se concentró como se ha descrito anteriormente.

Se repitió el procedimiento otras cuatro veces (adición de metanol, reflujo y concentración). Finalmente, se añadieron 126 mL de metanol, la solución se calentó a reflujo durante otra hora y se enfrió hasta temperatura ambiente.

Se introdujeron 15 mL de amoníaco a una velocidad constante durante 35 min hasta obtener un pH de 2.3-2.4. Se añadieron 75 mL de agua. Se eliminó el metanol mediante destilación a presión reducida y a una temperatura inferior a 50 °C. El pH de la solución de PGM final fue de 2.0 y la "proporción" fue del 99.0%.

45

**Ejemplo 5**

**Producción de PGM en forma de base libre utilizando centrífugas de extracción a contracorriente**

50 La línea de procesamiento representada en la Figura 1 operó como sigue:

- Se pusieron en funcionamiento las centrífugas y operaron a 2400 rpm.
- Se introdujo la solución de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 25% (p/p) en la centrífuga 2 con una velocidad de flujo de 7.5 kg/h. La mezcla de reacción (ver a continuación) se introdujo en la centrífuga 1 después de que hubiera un flujo desde la salida de la fase pesada de la centrífuga 1.
- Se añadieron 1000 mL de NaCl 5.3 M al recipiente de 10 L.
- Se enfrió el contenido del recipiente de 10 L hasta 8-10 °C.
- Se introdujo la solución de PGM en el recipiente de 10 L con un flujo de 15 kg/h.
- Se mantuvo un pH dentro del recipiente de 10 L de 9.7 mediante la adición de una solución de NaOH/NaCl.
- Se mantuvo un volumen dentro del recipiente de 10 L de 5 L mediante el ajuste del flujo de la mezcla de reacción que salía del recipiente.
- La temperatura dentro del recipiente de 10 L se mantuvo a 8-10 °C.
- La mezcla de reacción del recipiente de 10 L se bombeó a través de un intercambiador de calor y de esta manera se calentó hasta 30 °C. Posteriormente, la mezcla de reacción se introdujo en la centrífuga 1.
- La fase ligera de la centrífuga 2 se enfrió con un intercambiador de calor hasta 3-5 °C y se almacenó en el

- recipiente a 3-5 °C.
- La fase ligera se convirtió en Ampicilina en menos de 4 h después de producir dicha fase ligera.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para sintetizar un compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético a partir del resto  $\beta$ -lactámico del compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético y una cadena lateral seleccionada del grupo que consiste en D-fenilglicina y D-dihidrofénilglicina en forma de un éster de cadena lateral y una enzima que cataliza el acoplamiento del éster de cadena lateral con el resto  $\beta$ -lactámico del compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético, que se caracteriza por que el proceso comprende la formación del éster de cadena lateral donde dicho éster de cadena lateral no se aísla como un intermedio sólido.
- 10 2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación anterior, que comprende los pasos de:
  - 15 a) convertir la forma no derivatizada de la cadena lateral seleccionada del grupo que consiste en D-fenilglicina y D-dihidrofénilglicina, por reacción con un alcohol, para formar una mezcla que comprende el éster de cadena lateral correspondiente;
  - b) formar el compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético mezclando la mezcla obtenida en el paso (a) con un resto  $\beta$ -lactámico del compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético y la enzima para formar el compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético, con la condición de que el éster de cadena lateral formado en el paso (a) no se aísla como un intermedio sólido.
- 20 3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 2, donde la mezcla obtenida en el paso (a) se purifica antes de formar el compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético en el paso (b).
- 25 4. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el resto  $\beta$ -lactámico del compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético se selecciona del grupo que consiste en ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA), ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) y 7-amino-3-cloro-3-cefem-4-carboxilato (7-ACCA).
- 30 5. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto  $\beta$ -lactámico semisintético se selecciona del grupo que consiste en Ampicilina, Cefalexina, Cefradina y Cefaclor.
6. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 2, donde el alcohol es metanol o etanol, preferentemente metanol.
7. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enzima es una penicilina G acilasa, preferentemente en una forma inmovilizada.
8. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 7, donde la penicilina G acilasa es de *Escherichia coli*.

Figura 1

