

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 591 106**

51 Int. Cl.:

**C12P 35/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2010 PCT/EP2010/069575**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11073166**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2010 E 10794956 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2513327**

54 Título: **Proceso de producción para cefradina**

30 Prioridad:

**14.12.2009 EP 09179015**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**24.11.2016**

73 Titular/es:

**DSM SINOCHEM PHARMACEUTICALS  
NETHERLANDS B.V. (100.0%)  
Alexander Fleminglaan 1  
2613 AX Delft, NL**

72 Inventor/es:

**MOODY, HAROLD, MONRO y  
DOOREN, VAN, THEODORUS, JOHANNES,  
GODFRIED, MARIA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 591 106 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 de producción para cefradina

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un proceso enzimático para la preparación de cefradina en condiciones anaerobias.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 En un proceso químico para la producción de cefradina, el grupo amino en el ácido 7-aminodesacetoxi-  
cefalosporánico (7-ADCA) está acilado con una cadena lateral de dihidrofenilglicina (DHPG), mientras que el  
diclorometano se usa como disolvente. Por ejemplo, la sal de D(-)- $\alpha$ -2,5-dihidrofenilglicina-metil-sodio-Dane y el  
cloruro de pivaloilo en diclorometano pueden añadirse a una disolución de 7-ADCA y 1,8-diazabicyclo-(5,4,0)-undec-  
7-eno (DBU) en diclorometano. La mezcla de reacción resultante comprende cefradina con grupos protegidos. El uso  
de productos intermedios protegidos, tales como cefradina con grupos protectores, es característico de un proceso  
15 químico para la producción de cefalosporinas, por ejemplo, cefradina. Para eliminar los grupos protectores, se  
añaden agua y HCl a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción y la disolución ácida añadida forman un sistema  
bifásico, que posteriormente se separa en dos fases separadas, una fase orgánica que comprende principalmente  
diclorometano y ácido pivalico con algo de agua residual y una fase acuosa que comprende agua, cefradina y HCl en  
disolución, además de diclorometano residual. Normalmente, el pH de la disolución acuosa ácida, obtenida mediante  
dicho proceso químico para la producción de cefradina y la posterior separación de la mezcla de reacción, está por  
debajo de 3,2. Posteriormente, la cefradina formada se recupera de la fase acuosa por un desplazamiento de pH;  
20 puede añadirse un agente complejante. Por ejemplo, pueden añadirse DMF o quinolina para producir un complejo de  
cefradina sólido, que posteriormente se convierte en cefradina.

25 La gran desventaja de la síntesis química de los antibióticos semi-sintéticos en general y la cefradina en particular es  
que estos procesos químicos se llevan a cabo usando disolventes orgánicos tales como diclorometano y DMF. Esto  
hace que estos procesos sean perjudiciales para el medioambiente, ya que se produce mucho residuo químico/de  
disolventes.

Un avance importante en la síntesis de antibióticos semi-sintéticos vino con la introducción de enzimas que son  
capaces de acoplar la cadena lateral (por ejemplo PG, HPG, DHPG, todas en forma activada como amida o éster) a  
los núcleos (por ejemplo, 7-ADCA o 6-APA) en un entorno acuoso, evitando así el consumo de disolventes  
orgánicos.

30 El documento WO97/04086 desvela la producción enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactámicos haciendo reaccionar una  
 $\beta$ -lactama parental con una cadena lateral en forma activada, que incluye la preparación de cefradina haciendo  
reaccionar 7-ADCA con DHPG en forma activada (DHPGa). Esta publicación describe que, además de la reacción  
de síntesis, es decir, la reacción de la cadena lateral activada con la  $\beta$ -lactama parental, también se forman ácidos  
de cadena lateral mediante la hidrólisis de la cadena lateral activada y el producto deseado. El ácido de cadena  
35 lateral formado en caso de la producción enzimática de cefradina es D-dihidrofenilglicina (DHPG). El documento  
WO97/04086 desvela, entre otras cosas, la síntesis enzimática de cefradina en presencia de acilasa no mutante de  
*E. coli* y muestra que cuando la penicilina acilasa se inmovilizó sobre un vehículo específico, se obtuvo un aumento  
de la relación síntesis/hidrólisis (S/H). En el proceso del documento WO97/04086 se habían alcanzado conversiones  
de 7-ADCA y éster metílico de DHPG en cefradina de hasta el 68 %. En el documento WO2005/003367, el proceso  
40 enzimático del documento WO97/04086 mejora adicionalmente produciendo una conversión de 7-ADCA en  
cefradina de al menos el 70 %, mientras que se mantiene la concentración de D-dihidrofenilglicina (DHPG) en la  
mezcla de reacción por debajo del 2 % en peso.

45 La Farmacopea dicta que la cefradina, cuando se usa como un principio activo farmacéutico (API), no debe contener  
más del 5,0 % de cefalexina. La estructura molecular de la cefalexina se parece mucho a la de la cefradina, siendo la  
única diferencia la cadena lateral: DHPG en el caso de cefradina y PG en el caso de cefalexina.

50 La cefradina no es estable y, bajo la influencia del oxígeno, se convierte en cefalexina. Por este motivo, la cefradina,  
después de su producción industrial, normalmente se guarda y se manipula bajo condiciones tales que la oxidación  
se minimice. Por ejemplo, un envase adecuado es a vacío en bolsas selladas. Normalmente, la cefradina obtenida  
después del proceso de producción debe contener menos del 5,0 % dictado por la Farmacopea con el fin de permitir  
alguna formación de cefalexina durante el almacenamiento de la cefradina hasta su fecha de caducidad definitiva.

Otro motivo de la presencia de cefalexina en cefradina es que la DHPG, usada en la síntesis, ya está contaminada  
con algo de PG. Para DHPG de calidad industrial, la cantidad de PG puede ser de hasta el 2 % y normalmente es de  
aproximadamente el 1 %. La DHPG tampoco es estable y debe almacenarse y manipularse con precaución para  
prevenir la oxidación a PG. La síntesis química de la cefradina produce un producto que tiene aproximadamente 1,0-  
55 1,5 % de cefalexina.

Los inventores han encontrado ahora que en las condiciones de la síntesis enzimática de cefradina a partir de 7-ADCA y DHPG en forma activada y también durante la activación de DHPG, puede tener lugar más oxidación sustancial que produce cefradina que contiene niveles demasiado altos de cefalexina en comparación con la vía de síntesis química. Se obtuvieron niveles superiores a aquellos prescritos por la Farmacopea, por ejemplo, entre el 5-10 %. Por tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un proceso para la síntesis enzimática de cefradina a partir de 7-ADCA y DHPG bajo condiciones tales que se obtenga la cefradina que, también después del almacenamiento, todavía cumple con las estipulaciones de la Farmacopea.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

## Lista de abreviaturas

10	6-APA:	ácido 6-aminopenicilánico
	7-ADCA:	ácido 7-aminodesacetoxi-cefalosporánico
	DHPG:	D-dihidrofenilglicina
	DHPGa:	D-dihidrofenilglicina en forma activada
	DHPGM:	éster metílico de D-dihidrofenilglicina
15	DMF:	N,N-dimetilformamida
	DCME:	diclorometano
	HPG:	D-hidroxifenilglicina
	PG:	D-fenilglicina
	PGM:	éster metílico de D-fenilglicina

20 La invención proporciona un proceso para preparar cefradina, comprendiendo dicho proceso (a) convertir D-dihidrofenilglicina (DHPG) en una forma activada (DHPGa) que es una amida o un éster y (b) hacer reaccionar el ácido 7-aminodesacetoxi-cefalosporánico (7-ADCA) con D-dihidrofenilglicina en forma activada (DHPGa) en presencia de una penicilina acilasa en una mezcla de reacción acuosa para formar cefradina, caracterizado porque al menos la etapa (a) y la etapa (b) del proceso se llevan a cabo en condiciones anaerobias. La ventaja del proceso de la invención es que la cefradina se obtiene con contiene menores cantidades de cefalexina en comparación con el mismo proceso que no está siendo llevado a cabo en condiciones anaerobias.

Condiciones anaerobias se definen en el presente documento como aquellas condiciones a las que al menos una, o varias o preferentemente todas las etapas en el proceso para la producción de cefradina, se llevan a cabo en presencia de niveles de oxígeno que se han reducido al menos el 50 %, preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 90 %, lo más preferentemente al menos el 95 % en comparación con el nivel de oxígeno bajo condiciones no anaerobias, lo más preferentemente en ausencia de oxígeno. Hay diversas medidas que pueden usarse para obtener las condiciones anaerobias como se han definido anteriormente:

35 a. El proceso puede llevarse a cabo en presencia de eliminadores de oxígeno, es decir, compuestos que reaccionan con oxígeno de forma que la concentración eficaz del oxígeno reactivo disminuya. Eliminadores de oxígeno adecuados son ácido ascórbico, metabisulfito, ditiotritol, mercaptoetanol, ditiotrito y bisulfito. El más preferido es el bisulfito.

40 b. Uno o más de los materiales de partida, reactivos, disolventes y/o agua usados en el proceso puede desgasificarse. Un método adecuado para desgasificar es poner los materiales de partida, reactivos, disolventes y/o agua a condiciones de vacío de forma que se elimine el oxígeno; alternativamente, los materiales de partida, reactivos, disolventes y/o agua pueden lavarse con un gas inerte para sustituir el oxígeno. Gases inertes adecuados son nitrógeno, helio, argón y otros. El más preferido es el nitrógeno.

c. El proceso puede llevarse a cabo en una atmósfera que comprende un gas inerte. Gases inertes adecuados son nitrógeno, helio, argón y otros. El más preferido es el nitrógeno.

45 Preferentemente, el proceso se lleva a cabo aplicando cualquier combinación de las medidas (a), (b) y (c) enumeradas anteriormente, por ejemplo (a) + (b) o (a) + (c) o (b) + (c). Lo más preferentemente, el proceso se lleva a cabo aplicando todas las medidas (a) + (b) + (c).

50 En el proceso de la invención, el DHPGa en la forma activada puede ser una amida o un éster, preferentemente DHPGa es un éster, tal como el éster metílico o el éster etílico. En una realización preferida del proceso de la invención, la DHPG se convierte en un éster poniendo en contacto la DHPG con un alcohol para formar una mezcla que comprende el éster de cadena lateral correspondiente. El alcohol usado en el proceso de la invención puede

seleccionarse del grupo que consiste en metanol y etanol, formando así el éster metílico y el éster etílico de la cadena lateral, respectivamente.

La etapa (b) del proceso puede llevarse a cabo como se desvela en el documento WO2005/003367, a condición de que se lleve a cabo en condiciones anaerobias según el proceso de la presente invención. Así, la etapa (b) puede llevarse a cabo haciendo reaccionar anaeróticamente 7-ADCA con DHPGa, que puede producir una conversión de DHPGa dentro de la cefradina de al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 %, en el que la conversión de DHPGa en CEF =  $(n_{\text{CEF}} / n_{\text{DHPGa}}) * 100 \%$ , en la que  $n_{\text{CEF}}$  = cantidad total de cefradina formada (en moles); y  $n_{\text{DHPGa}}$  = cantidad total de DHPGa añadida a la mezcla de reacción (en moles).

La DHPGa en la mezcla de reacción puede añadirse de muchas formas. Toda la DHPGa puede añadirse, inicialmente, es decir, al inicio de la reacción, por ejemplo, en un proceso discontinuo. También es posible añadir al menos parte de la DHPGa a la mezcla de reacción durante el transcurso de la reacción.

La concentración de DHPG en la mezcla de reacción puede mantenerse por debajo del 2 % en peso durante toda la reacción, preferentemente por debajo del 1,5 % en peso, preferentemente por debajo del 1 % en peso, más preferentemente por debajo del 0,8 % en peso, por ejemplo, controlando el pH de la mezcla de reacción y/o la temperatura. El pH y la temperatura aplicados pueden variar entre amplios intervalos. La reacción para formar la cefradina puede, por ejemplo, llevarse a cabo a una temperatura de entre -5 y 35 °C, preferentemente entre 0 y 30 °C. Más preferentemente, la reacción se lleva a cabo a una temperatura de entre 5 °C y 25 °C. La reacción para formar la cefradina puede, por ejemplo, llevarse a cabo a un pH de entre 6 y 9. Preferentemente, la reacción se lleva a cabo a un pH de entre 6,3 y 8,5. El pH de la mezcla de reacción puede ajustarse al valor de pH deseado de varias formas, por ejemplo, añadiendo químicamente un ácido, por ejemplo un ácido mineral, en particular ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o ácido nítrico. El pH también puede ajustarse al valor de pH deseado añadiendo una base, por ejemplo, hidróxido sódico o amoníaco.

La concentración de DHPG en la mezcla de reacción también puede mantenerse por debajo del 2 % en peso durante toda la reacción, preferentemente por debajo del 1,5 % en peso, preferentemente por debajo del 1 % en peso, más preferentemente por debajo del 0,8 % en peso, trabajando a concentraciones diluidas de los reactivos 7-ADCA y DHPGa o usando una enzima con propiedades mejoradas, por ejemplo, una relación S/H mejorada, que puede ser una enzima no mutante o mutante. El mantenimiento de la concentración de DHPG baja según la invención permite aumentar la conversión. Esto puede entonces lograrse, por ejemplo, aplicando un tiempo de residencia que es suficientemente largo.

El proceso de la invención que incluye la etapa (a) y (b) también puede llevarse a cabo como se ha desvelado en el documento WO 2008/110527, a condición de que se lleve a cabo en condiciones anaerobias según el proceso de la presente invención. En este proceso, la DHPGa que se forma anaeróticamente en la etapa (a) según el proceso de la presente invención no se aísla como un producto intermedio sólido. El proceso puede comprender, por ejemplo, las siguientes etapas:

a) convertir anaeróticamente DHPG con un alcohol para formar una mezcla que comprende el éster de cadena lateral correspondiente; la formación del éster de cadena lateral en esta etapa produce preferentemente una mezcla con una conversión que se expresa por la "relación" que se define como:

[éster de DHPG]

[éster de DHPG] + [DHPG]

y por el cual la relación es preferentemente  $\geq 85 \%$ , más preferentemente  $\geq 90 \%$ , más preferentemente  $\geq 95 \%$ , más preferentemente  $\geq 96 \%$ , más preferentemente  $\geq 97 \%$ , más preferentemente  $\geq 98 \%$ , lo más preferentemente  $\geq 99 \%$ ;

b) formar anaeróticamente la cefradina mezclando la mezcla obtenida en la etapa a) con 7-ADCA y la enzima para formar cefradina, con la condición de que el éster de cadena lateral formado en la etapa (a) no se aisle como un producto intermedio sólido.

En la etapa de conversión (etapa (a)) del proceso de la invención, la DHPG se convierte con un alcohol para formar una mezcla que comprende el éster de cadena lateral correspondiente en condiciones anaerobias. El alcohol usado en el proceso de la invención puede seleccionarse del grupo que consiste en metanol y etanol, formando así el éster metílico y el éster etílico de la cadena lateral, respectivamente. El alcohol más preferido es metanol. La etapa (a) puede llevarse a cabo de varias formas.

Una realización de la etapa de conversión (a) comprende calentar una mezcla que comprende una cadena lateral libre seleccionada del grupo que consiste en D-fenilglicina y DHPG, un alcohol seleccionado basándose en el éster deseado que va a formarse, por ejemplo metanol para obtener el éster metílico o etanol para obtener el éster etílico, y un ácido fuerte tal como ácido sulfúrico, a reflujo a una temperatura entre 20 y 120 °C, más preferentemente entre 40 y 100 °C. Si se usa metanol como el alcohol, la temperatura es preferentemente entre 60 y 80 °C. Si se usa

etanol como el alcohol, la temperatura es preferentemente entre 65 y 100 °C. Condiciones adecuadas pueden encontrarse en los Ejemplos comparativos 1 y 2 como se desvela en el documento EPA-0544205.

5 Otra realización de la etapa de conversión (a) comprende una mejora de la realización previa y comprende la adición del alcohol como un líquido o un gas a la mezcla de reacción, mientras que se separa por destilación el alcohol y el agua de la reacción (por ejemplo, como se describe en el documento EP-A-0544205).

Una realización altamente preferida de la etapa de conversión (a) y que produce una mezcla que comprende DHPGMe comprende las siguientes etapas:

10 1. someter a reflujo una mezcla de reacción que comprende DHPG, metanol y un ácido fuerte tal como 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 en la temperatura entre 20 y 120 °C, más preferentemente entre 20 y 100 °C, más preferentemente entre 40 y 100 °C, lo más preferentemente entre 60 y 80 °C; seguido de

15 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 esta etapa puede ser inicialmente atmosférica y puede reducirse durante la etapa de concentración a preferentemente 50 mbar o menos, más preferentemente a 40 mbar o menos, más preferentemente a 30 mbar o menos y lo más preferentemente a 20 mbar o menos. La etapa de concentración continúa hasta que se elimine más del 30 % del agua presente antes de la etapa 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 lo más preferentemente se elimina más del 90 % del agua.

25 3. añadir metanol, preferentemente una cantidad para obtener el volumen inicial de la mezcla de reacción antes de la etapa de concentración o una cantidad que es inferior al 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 de metanol añadida también puede ser superior al volumen inicial de la mezcla de reacción.

30 4. opcionalmente repetir las etapas 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 encontró que repitiendo estas etapas, la "relación", como se define anteriormente en este documento, de formación de éster metílico aumentó significativamente. Por ejemplo, después de llevar a cabo las etapas (a) - (c) solo una vez, puede obtenerse una "relación" entre el 75-85 %, después de repetir las etapas (a) - (c) una vez, puede obtenerse una "relación" entre el 85-95 %, y después de repetir las etapas (a) - (c) 2 veces, puede obtenerse una "relación" entre el 95-97 %, y después de repetir las etapas (a) - (c) 3 veces, puede obtenerse una "relación" entre el 97-98 % y después de repetir las etapas (a) - (c) 4 veces, puede obtenerse una "relación" entre el 98-99 % y después de repetir las etapas (a) - (c) 5 veces, puede obtenerse una "relación" entre 99-99,5 % y después de repetir las etapas (a) - (c) más de 5 veces puede obtenerse una "relación" superior al 99,5 %.

40 Otra realización altamente preferida de la etapa de conversión (a) y que produce una mezcla que comprende el éster etílico de la cadena lateral comprende las siguientes etapas:

45 1. someter a reflujo una mezcla de reacción que comprende DHPG, etanol y un ácido fuerte tal como 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 en la temperatura entre 20 y 120 °C, más preferentemente entre 20 y 100 °C, más preferentemente entre 40 y 100 °C, lo más preferentemente entre 65 y 100 °C; seguido de

50 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 esta etapa puede ser inicialmente atmosférica y puede reducirse durante la etapa de concentración a preferentemente 50 mbar o menos, más preferentemente a 40 mbar o menos, más preferentemente a 30 mbar o menos y lo más preferentemente a 20 mbar o menos. La etapa de concentración continúa hasta que se elimine más del 30 % del agua presente antes de la etapa de concentración, preferentemente superior a 40 % del agua se elimina, 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 lo más preferentemente se elimina más del 90 % del agua.

55 3. añadir etanol, preferentemente una cantidad para obtener el volumen inicial de la mezcla de reacción antes de la etapa de concentración o una cantidad que es inferior al 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 de etanol añadida también puede ser superior al volumen inicial de la mezcla de reacción.

4. opcionalmente, repetir las etapas 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 encontró que repitiendo estas etapas, la "relación", como se define anteriormente en este documento, de formación de éster metílico aumentó significativamente. Por ejemplo, después de llevar a cabo las etapas (a) - (c) solo una vez, puede obtenerse una "relación" entre el 75-85 %, después de repetir las etapas (a) - (c) una vez, puede obtenerse una "relación" entre el 85-95 %, y después de repetir las etapas (a) - (c) 2 veces, puede obtenerse una "relación" entre el 95-97 %, y después de repetir las etapas (a) - (c) 3 veces, puede obtenerse una "relación" entre el 97-98 % y después de repetir las etapas (a) - (c) 4 veces, puede obtenerse una "relación" entre el 98-99 % y después de repetir las etapas (a) - (c) 5 veces, puede obtenerse una "relación" entre el 99-99,5 % y después de repetir las etapas (a) - (c) más de 5 veces, puede obtenerse una "relación superior al 99,5 %.

En todas las realizaciones de la etapa (a), preferentemente se usa la siguiente relación molar de alcohol frente a DHPG: entre 3 y 25, más preferentemente entre 5 y 25, y lo más preferentemente entre 6 y 10. Por tanto, en todas las realizaciones de la etapa (a), preferentemente se usa la siguiente relación molar de ácido fuerte (en equivalentes, por ejemplo un mol de ácido clorhídrico es un equivalente y un mol de ácido sulfúrico es dos equivalentes) frente a cadena lateral libre: entre 0,9 y 10, más preferentemente entre 1 y 5, y lo más preferentemente entre 2 y 3. El experto será capaz de optimizar las condiciones de reacción dependiendo de la cadena lateral y el alcohol seleccionado sin excesiva experimentación.

Antes de formar la cefradina en la etapa (b), la mezcla obtenida en la etapa (a) puede purificarse para obtener una mezcla con una "relación" alta como se define anteriormente en este documento. La relación de la mezcla que va a usarse en la etapa (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  $\geq 98$  %, lo más preferentemente  $\geq 99$  %.

Una realización de la etapa de purificación implica la precipitación y eliminación de la DHPG del éster de DHPG. Esto puede lograrse ajustando el pH de la mezcla obtenida en la etapa (a) a un valor entre 2 y 6,5, preferentemente entre 2,5 y 5, lo más preferido entre 3 y 4, añadiendo una base adecuada, tal como NaOH, amoníaco, KOH. En otra realización, la mezcla de reacción obtenida en la etapa (a) puede añadirse a una cantidad adecuada de agua o a un alcohol o a una mezcla de agua y alcohol, seguido de ajustar el pH a un valor entre 2 y 6,5, preferentemente entre 2,5 y 5, lo más preferido entre 3 y 4, añadiendo una base adecuada, tal como NaOH, amoníaco, KOH. Después de ajustar el pH al valor deseado, el pH puede mantenerse al valor deseado añadiendo la base adecuada. Bajo estas condiciones puede formarse un precipitado que comprende la cadena lateral libre. Después de un tiempo adecuado, el precipitado puede separarse por filtración usando técnicas conocidas. El filtrado comprende el éster de cadena lateral. Con el fin de ser usado directamente en la etapa (b) del proceso de la invención, el pH del filtrado se lleva a un pH entre 1 y 6, preferentemente entre 1 y 4, lo más preferentemente entre 1,5 y 3, después de lo que el alcohol se elimina mediante evaporación usando técnicas conocidas.

Otra realización de la etapa de purificación implica la formación de un sistema bi- o multifásico que comprende una fase orgánica que contiene el éster de cadena lateral derivado y una cantidad menor de cadena lateral libre y una fase acuosa que contiene la cadena lateral libre y, opcionalmente, sal. Esto puede lograrse ajustando el pH de la mezcla obtenida en la etapa (a) a un valor entre 7,5 y 10, preferentemente entre 8,5 y 9,5, lo más preferido entre 8,8 y 9,2, añadiendo una base adecuada, tal como NaOH, amoníaco, KOH. En otra realización, la mezcla de reacción obtenida en la etapa (a) puede añadirse a una cantidad adecuada de agua, un alcohol o a una mezcla de agua y alcohol, seguido de ajustar el pH a un valor entre 7,5 y 10, preferentemente entre 8,5 y 9,5, lo más preferido entre 8,8 y 9,2, añadiendo una base adecuada, tal como NaOH, amoníaco, KOH. Después de ajustar el pH al valor deseado, el pH puede mantenerse al valor deseado añadiendo la base adecuada. Opcionalmente, el agua puede estar en forma de una disolución acuosa de sal (por ejemplo, NaCl). La cadena lateral libre también puede formar un precipitado. Las diversas fases en el sistema multifásico pueden separarse usando técnicas conocidas. Opcionalmente, la fase orgánica puede lavarse con agua o una disolución acuosa de sal. La fase acuosa del lavado puede recircularse a una corriente de proceso adecuada con el fin de evitar la pérdida de rendimiento. Esta corriente de proceso puede ser la mezcla de reacción como se obtiene después de la etapa (a) o después del ajuste del pH como se ha descrito.

Una realización altamente preferida de la etapa de purificación combina las dos realizaciones previas, es decir, primero ajustar el pH de la mezcla obtenida en la etapa (a) entre 2 y 6,5, preferentemente entre 2,5 y 5, lo más preferido entre 3 y 4, y separar por filtración el precipitado formado y posteriormente ajustar el pH del filtrado obtenido a un pH entre 7,5 y 10, preferentemente entre 8,5 y 9,5, lo más preferido entre 8,8 y 9,2, y separar las diversas fases en el sistema multifásico obtenido usando técnicas conocidas.

Se ha encontrado sorprendentemente que en las dos realizaciones previas en las que el sistema multifásico se forma a un pH entre 7,5 y 10, preferentemente entre 8,5 y 9,5, lo más preferido entre 8,8 y 9,2, puede dar un éster, seleccionado preferentemente del grupo que consiste en éster metílico de DHPG y éster etílico de DHPG, en la forma de base libre, por lo que el éster tiene las siguientes propiedades:

- 5           • un e.e. (exceso enantiomérico) preferentemente igual o superior al 90 %, más preferentemente igual o superior al 95 %, preferentemente igual o superior al 96 %, preferentemente igual o superior al 97 %, preferentemente igual o superior al 98 % y lo más preferentemente igual o superior al 99 %; y
- un contenido de sal preferentemente del 20 % en moles o menos, más preferentemente del 10 % en moles o menos, más preferentemente del 5 % en moles o menos, más preferentemente del 2 % en moles o menos, lo más preferentemente del 1 % en moles o menos, expresado como moles de sal con respecto a moles de éster.
- 10          • una "relación", como se define anteriormente en este documento, de preferentemente  $\geq 85$  %, más preferentemente  $\geq 90$  %, más preferentemente  $\geq 95$  %, más preferentemente  $\geq 96$  %, más preferentemente  $\geq 97$  %, más preferentemente  $\geq 98$  %, lo más preferentemente  $\geq 99$  %.

15       En la etapa (b) del proceso de la invención, la cefradina se forma mezclando la mezcla obtenida en la etapa (a), purificada opcionalmente como se ha descrito anteriormente en este documento con 7-ADCA y una enzima penicilina acilasa, preferentemente una enzima inmovilizada, para formar el compuesto de  $\beta$ -lactama semi-sintético correspondiente, todo en condiciones anaerobias. Después del acoplamiento enzimático, la cefradina puede recuperarse usando métodos conocidos. Por ejemplo, el reactor de enzima puede descargarse a través del tamiz de fondo usando agitación hacia arriba. La suspensión de cefradina resultante puede entonces filtrarse a través de un filtro de vidrio. Debido a la baja cantidad de DHPG presente después de la reacción de acoplamiento enzimática, puede llevarse a cabo la cristalización de la cefradina final a altas concentraciones de la cefradina que produce altos rendimientos.

20       La enzima que es adecuada como catalizador en hacer reaccionar 7-ADCA con DHPG en forma activada para preparar cefradina en el proceso según la invención se conoce con el término general penicilina acilasa, o penicilina G acilasa, también llamada penicilina G amidasa o bencilpenicilina acilasa (EC 3.5.1.11). La penicilina G acilasa se refiere a un grupo de hidrolasas de microorganismos, especialmente bacterias, capaces de hidrolizar el grupo 6-acilo de penicilinas o el grupo 7-acilo de cefalosporinas. Las enzimas penicilina acilasa pueden clasificarse tanto basándose en su especificidad por sustrato como basándose en su estructura molecular, que se describe en diversas publicaciones, véanse, por ejemplo, los documentos WO 03/055998 y WO 98/20120.

25       Microorganismos de los que pueden obtenerse las enzimas penicilina acilasa son, por ejemplo, *Acetobacter*, en particular *Acetobacter pasteurianum*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, en particular *Alcaligenes faecalis*, *Aphanocladium*, *Bacillus sp.*, en particular *Bacillus megaterium*, *Cephalosporium*, *Escherichia*, en particular *Escherichia coli*, *Flavobacterium*, *Fusarium*, en particular *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, *Kluyvera*, *Mycoplana*, *Protaminobacter*, *Proteus*, en particular *Proteus rettgeri*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, en particular *Xanthomonas citrii*.

30       En una realización de la invención, la enzima puede inmovilizarse sobre un vehículo. En forma inmovilizada, la enzima puede separarse fácilmente y recircularse. Las enzimas inmovilizadas se conocen como tales y están comercialmente disponibles, por ejemplo, una penicilina acilasa de *E. coli* aislada como se describe en el documento WO 92/12782 e inmovilizada como se describe en los documentos EP222462 y en WO97/04086. El proceso para preparar la cefradina según la invención puede llevarse a cabo a cualquier pH y temperatura adecuado, por ejemplo, dependiendo de la enzima usada. Por ejemplo, el proceso que comprende hacer reaccionar 7-ADCA con DHPG para formar cefradina puede llevarse a cabo en presencia de una penicilina acilasa no mutante y a una temperatura por debajo de 15 °C. Preferentemente, el proceso que comprende hacer reaccionar 7-ADCA con DHPG para formar cefradina en presencia de una penicilina acilasa no mutante se lleva a cabo a una temperatura por debajo de 15 °C y a un pH de al menos 7,0.

35       Para enzimas que tienen una elevada relación S/H con respecto a la acilasa no mutante de *E. coli*, se logran elevadas conversiones si la reacción se lleva a cabo a temperatura relativamente alta, por ejemplo, por encima de 15 °C, preferentemente entre 15 y 30 °C, y pH relativamente bajo, por ejemplo, por debajo de 7,7, preferentemente entre 6 y 7,5. Por tanto, la presente divulgación también se refiere a un proceso que comprende hacer reaccionar 7-ADCA con DHPG en condiciones anaerobias para formar cefradina que se lleva a cabo en presencia de una enzima que es una acilasa que tiene una mayor relación S/H, preferentemente una  $S/H_{ini}$  mayor que la de la acilasa no mutante de *E. coli* y a una temperatura de al menos 15 °C, preferentemente entre 15 y 30 °C. Preferentemente, la reacción de 7-ADCA con DHPG para formar la cefradina en presencia de una enzima que es una acilasa que tiene una mayor relación S/H que la acilasa no mutante de *E. coli* se lleva a cabo a una temperatura de al menos 15 °C, preferentemente entre 15 y 30 °C, y a un pH de por debajo de 7,7, preferentemente entre 6 y 7,5.

Esto es sorprendente ya que en el caso de la enzima que tiene una relación S/H relativamente baja se encontró que las mayores conversiones se lograron a temperatura relativamente baja y pH relativamente alto. El efecto anterior es

en particular pronunciado cuando la acilasa que tiene una elevada relación S/H tiene una actividad enzimática más baja que la de la acilasa no mutante de *E. coli*.

La acilasa que tiene una mayor relación S/H que la acilasa no mutante de *E. coli* puede ser cualquier enzima. La enzima puede ser, por ejemplo, una penicilina acilasa mutante. Los mutantes de penicilina acilasas o mutantes de acilasa pueden prepararse a partir de cualquier penicilina acilasa conocida. Las acilasas mutadas se derivan, por ejemplo, de acilasas no mutantes mediante la metodología de ADN recombinante conocida en la técnica, sustituyendo un resto de aminoácido con un resto nuevo.

En una realización preferida, la enzima es una penicilina acilasa mutante que tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 24 de la subunidad  $\beta$  correspondiente a la subunidad  $\beta$  de penicilina acilasa de *E. coli*. En una realización preferida, la L-fenilalanina en la posición 24 de la subunidad  $\beta$  correspondiente a la subunidad  $\beta$  de penicilina acilasa de *E. coli* se ha sustituido en esa posición con L-alanina, como se describe en el documento WO 98/20210. Esta mutación puede aplicarse sobre una PenG acilasa de *E. coli*, pero también pueden usarse PenG acilasas de otras fuentes. La numeración de la posición de los aminoácidos se corresponde con la numeración de la secuencia de aminoácidos de penicilina G acilasa no mutante de *E. coli*.

Como se define en el presente documento, se entiende que la relación de síntesis/hidrólisis (S/H) es la relación molar de producto de síntesis con respecto a producto de hidrólisis en un momento particular durante la reacción enzimática. Se entiende que el producto de síntesis es el antibiótico de  $\beta$ -lactama formado a partir de la cadena lateral activada y el núcleo de  $\beta$ -lactama. Se entiende que el producto de hidrólisis es el ácido correspondiente de la cadena lateral activada.

La relación S/H es una función de la concentración de los reactantes, la relación molar de cadena lateral activada con respecto a núcleo de  $\beta$ -lactama, la temperatura, el pH y la enzima. En la situación ideal se lleva a cabo un experimento comparativo en el que el candidato particular se prueba contra una enzima de referencia, preferentemente PenG acilasa de *E. coli*, bajo las mismas condiciones.

Durante una reacción de acilación enzimática, la relación S/H generalmente disminuye. La relación S/H de diferentes penicilina acilasas se comparan preferentemente a conversión igual. Lo más normalmente se comparan al 0 % de conversión (por lo tanto, a tiempo  $t=0$ ), la llamada relación S/H inicial (S/Hini), que así es una medida de la relación S/H. La S/Hini puede determinarse con exactitud suficiente llevando a cabo la reacción de acilación hasta que se alcanza una conversión suficientemente alta, de manera que los productos, en particular el producto de hidrólisis, pueden medirse con exactitud y entonces construir una gráfica de S/Hini frente a la conversión y extrapolarla al 0 % de conversión. Podría ser necesario determinar la relación S/H inicial mediante extrapolación, ya que se forma demasiado poco producto de hidrólisis a baja conversión para la determinación precisa de S/Hini. Los algoritmos de ajuste de curva que se conocen en la técnica pueden aplicarse para conseguir una extrapolación más fiable. Para la determinación precisa es necesario tener puntos de datos suficientes. Puntos de datos suficientes significa al menos tres puntos de datos, que deben representar una diferencia en la conversión de al menos el 0,5 %.

La actividad enzimática puede generalmente definirse como la cantidad molar de reactante o producto que se convierte o sintetiza por unidad de tiempo y por cantidad de enzima disuelta o inmovilizada en un momento particular durante la reacción de acilación enzimática. Preferentemente, se aplican enzimas en forma inmovilizada y la actividad enzimática se define por la cantidad de enzima inmovilizada. La actividad enzimática por cantidad de enzima frecuentemente también se indica como la actividad específica de la enzima particular.

El proceso según la invención puede llevarse a cabo de varias formas, por ejemplo, en cultivo discontinuo o continuo. Preferentemente, el proceso según la invención se lleva a cabo en un proceso discontinuo. Un cultivo discontinuo puede ser un cultivo discontinuo, un cultivo de lotes alimentados, una combinación de modo discontinuo y de lotes alimentados, modo de lotes alimentados repetido o cualquier otra combinación.

La cefradina formada por el proceso según la invención puede cristalizarse en cualquier manera adecuada.

La cefradina hidratada que tiene una elevada estabilidad se obtiene preferentemente según las realizaciones preferidas descritas en lo sucesivo.

Preferentemente, el proceso comprende cristalizar la cefradina en una disolución acuosa. La disolución acuosa puede contener un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos, preferentemente menos del 30 % en vol., más preferentemente menos del 20 % en vol., más preferentemente menos del 10 % en vol., más preferentemente menos del 5 % en vol. (con respecto al volumen total del líquido). Preferentemente, el disolvente orgánico es un alcohol con 1-7 átomos de carbono, por ejemplo un monoalcohol, en particular metanol o etanol; un diol, en particular etilenglicol, o un triol, en particular glicerol. Preferentemente, la disolución acuosa contiene al menos el 70 % en vol. de agua, más preferentemente al menos el 80 % en vol., más preferentemente al menos el 90 % en vol., lo más preferentemente al menos el 95 % en vol. de agua (con respecto al volumen suma del líquido).

La disolución acuosa puede contener 7-ADCA y/o DHPG.

La cefradina puede cristalizarse en cualquier forma adecuada, normalmente en forma de cefradina hidratada, que no se limita a una cefradina hidratada específica. Normalmente, la cefradina hidratada es cefradina monohidratada. El contenido de agua de la cefradina hidratada puede oscilar, por ejemplo, entre el 3 % y el 6 % por peso. Preferentemente, la cefradina se cristaliza en una disolución acuosa en la que la relación  $m_{\text{CEF}}/(m_{7\text{-ADCA}} + m_{\text{CEF}}) > 0,7$ , preferentemente  $> 0,8$ , más preferentemente  $> 0,9$ , y en la que  $x_{\text{DH}}$  está entre el 0 y el 2 % en peso, preferentemente entre el 0 y el 1 % en peso, en la que

$m_{\text{CEF}}$  = cantidad molar de cefradina en la disolución acuosa;

$m_{7\text{-ADCA}}$  = cantidad molar de 7-ADCA en la disolución acuosa; y

$x_{\text{DH}}$  = concentración de DH en la disolución acuosa con respecto al peso total de la disolución acuosa. El peso total de la disolución acuosa incluye el peso de la fase líquida y el peso de cualquier componente sólido presente en la disolución acuosa, por ejemplo, cefradina hidratada.

Se encontró que la disolución acuosa preferida puede obtenerse eficazmente por el proceso según la invención produciendo elevadas conversiones y bajas concentraciones de DH.

Se encontró que la cristalización de cefradina en la disolución acuosa preferida produjo una calidad mejorada de la cefradina cristalizada.

Por tanto, la presente divulgación también se refiere a un proceso que comprende hacer reaccionar ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA) con D-dihidrofeninglicina en forma activada (DHPGa) en presencia de una enzima en una mezcla de reacción para formar cefradina; y cristalizar la cefradina en una disolución acuosa, en la que la disolución acuosa la relación  $m_{\text{CEF}}/(m_{7\text{-ADCA}} + m_{\text{CEF}}) > 0,7$ , preferentemente  $> 0,8$ , más preferentemente  $> 0,9$ , y en la que  $x_{\text{DH}}$  está entre el 0 y el 2 % en peso, preferentemente entre el 0 y el 1 % en peso.

Preferentemente, la concentración de 7-ADCA en la disolución acuosa está entre el 0 y el 5 % en peso, preferentemente entre el 0 y el 2 % en peso del peso total de la disolución acuosa. Se encontró que esto produjo otra mejora de la calidad de la cefradina cristalizada.

La disolución acuosa que comprende la cefradina puede prepararse de cualquier forma adecuada.

Preferentemente, el proceso para preparar la cefradina comprende separar la enzima de la cefradina antes de dicha cristalización. La enzima puede, por ejemplo, separarse de la mezcla de reacción que comprende la cefradina, por ejemplo, tamizando la mezcla de reacción sobre un tamiz para separar la enzima de la cefradina. En la mezcla de reacción, parte de la cefradina puede estar presente en forma de cefradina hidratada, y el proceso puede comprender disolver la cefradina hidratada, y separar la enzima de la disolución resultante. El separar la enzima de una disolución acuosa que comprende cefradina disuelta puede realizarse, por ejemplo, según cualquier método adecuado, tal como filtración o centrifugación.

En una realización del proceso, parte de la cefradina formada está presente en la mezcla de reacción como cefradina hidratada, y el proceso comprende además disolver al menos parte de dicha cefradina hidratada.

La cefradina hidratada puede disolverse de cualquier forma adecuada. El disolver la cefradina hidratada puede realizarse, por ejemplo, a un pH a o por encima de 8, más preferentemente, a un pH de entre 8,3 y 9,5, y lo más preferentemente a un pH de entre 8,5 y 9, o a un pH inferior a 3,0, más preferentemente inferior a 2,5, lo más preferentemente a pH inferior a 2,0. En una realización preferida, el disolver la cefradina hidratada se realiza, por ejemplo, modificando, en particular aumentando el pH de la mezcla de reacción a un valor a o por encima de 8, preferentemente, a un pH de entre 8,3 y 9,5, y lo más preferentemente a un pH de entre 8,5 y 9. El pH de la mezcla de reacción puede aumentarse al valor de pH deseado añadiendo una base adecuada, por ejemplo, hidróxido sódico o amoníaco. Dicha disolución puede llevarse a cabo discontinua o continuamente. También es posible separar la cefradina hidratada de la mezcla de reacción, y disolver la cefradina hidratada separada para formar la disolución acuosa.

La cristalización de la cefradina en una disolución acuosa que comprende cefradina puede llevarse a cabo a cualquier temperatura adecuada. Sorprendentemente, los presentes inventores encontraron que se logra calidad de producto mejorada cuando la cristalización se efectúa a temperatura elevada. La cefradina cristalizada a estas temperaturas puede haber sido preparada química o enzimáticamente.

Por consiguiente, la presente divulgación también se refiere a un proceso para preparar cristales de cefradina, caracterizado porque el proceso comprende cristalizar la cefradina en una disolución acuosa para formar cristales de cefradina, en el que dicha cristalización se lleva a cabo a una temperatura de entre 45 y 65 °C, preferentemente entre 45 y 60 °C, preferentemente entre 48 y 55 °C. Lo más preferentemente, la cristalización se realiza a una temperatura entre 49 y 52 °C. La cefradina preparada en un proceso enzimático haciendo reaccionar 7-ADCA con DHPGa en presencia de una enzima en una mezcla de reacción para formar cefradina, preferentemente en un proceso según la presente divulgación, puede cristalizarse ventajosamente a las temperaturas desveladas anteriormente. Sin embargo, las temperaturas para la cristalización no se limitan a la cristalización de cefradina

preparada en un proceso enzimático, y pueden, por ejemplo, aplicarse ventajosamente para la cristalización de cefradina preparada en un proceso químico (por ejemplo, en ausencia de una enzima).

5 La cefradina preparada en un proceso enzimático haciendo reaccionar 7-ADCA con DHPGa en presencia de una enzima en una mezcla de reacción para formar cefradina, preferentemente en un proceso según la presente divulgación, también puede cristalizarse a una temperatura entre 35 y 60 °C, por ejemplo, a una temperatura entre 35 y 55 °C, por ejemplo, a una temperatura entre 35 y 45 °C.

10 La cristalización de cefradina en una disolución acuosa que comprende cefradina puede realizarse a cualquier pH adecuado. Preferentemente, la cristalización de la cefradina puede realizarse a un pH de entre 4,0 y 6,0, preferentemente a un pH de entre 4,5 y 5,5, más preferentemente a un pH de entre 4,7 y 5. Sorprendentemente se encontró que a los intervalos de pH preferidos a los que se realiza la cristalización, el rendimiento de los cristales de cefradina aumentó. En la región estructural del presente proceso, el pH de la disolución acuosa puede ajustarse de varias formas, por ejemplo químicamente, añadiendo un ácido, por ejemplo un ácido mineral, en particular ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o ácido nítrico. Preferentemente, dicha cristalización se realiza continuamente.

15 Se encontró sorprendentemente que la aplicación de las condiciones preferidas producía la cefradina hidratada que presentaba una elevada estabilidad en la prueba de estabilidad medida por una disminución de la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm.

El proceso según la presente divulgación también comprende realizar dicha cristalización a tal pH y a tal temperatura que la absorbancia a 450 nm de la cefradina hidratada preparada esté por debajo de 0,050, preferentemente por debajo de 0,040, y lo más preferentemente por debajo de 0,030, normalmente por encima de 0,005.

20 En una realización del proceso, la reacción enzimática se lleva a cabo en presencia de bisulfito sódico. Preferentemente, la cantidad de bisulfito sódico presente en la reacción enzimática es entre 1 y 25 mM, preferentemente entre 5 y 15 mM. Sorprendentemente, la presencia de bisulfito sódico durante la reacción enzimática disminuyó la coloración de la cefradina preparada.

25 El bisulfito sódico también puede estar presente durante la cristalización de cefradina en el proceso según la invención. Preferentemente, la cantidad de bisulfito sódico presente durante la cristalización de cefradina para formar los cristales de cefradina monohidratada es entre 5 y 250 mM, más preferentemente entre 25 y 150 mM. La cefradina hidratada puede separarse de la disolución acuosa y secarse de cualquier manera adecuada.

La cefradina hidratada obtenible por el proceso como se describe en el presente documento tiene preferentemente las siguientes propiedades:

30 a.  $\leq 5$  % de cefalexina, más preferentemente  $\leq 4$  % de cefalexina, más preferentemente  $\leq 5$  % de cefalexina incluso más preferentemente  $\leq 2$  % de cefalexina y lo más preferentemente  $\leq 1$  % de cefalexina, y/o

35 b. una absorbancia a 450 nm de por debajo de 0,2, preferentemente por debajo de 0,15, más preferentemente por debajo de 0,1, más preferentemente por debajo de 0,05. Preferentemente, la cefradina hidratada tiene una absorbancia de entre 0,001 y 0,2, preferentemente entre 0,002 y 0,15, más preferentemente entre 0,004 y 0,1, más preferentemente entre 0,005 y 0,05, y más preferentemente de entre 0,010 y 0,040; y/o

40 c. una alta estabilidad del color en la prueba de estabilidad a la tensión, es decir, la coloración de la cefradina hidratada está por debajo de 0,20, más preferentemente por debajo de 0,15, y lo más preferentemente por debajo de 0,10 a una absorbancia de 450 nm después de 8 semanas de almacenamiento a 40 °C a una humedad relativa del 75 %; y/o

45 d. no contiene, o sustancialmente no contiene, disolventes orgánicos. Preferentemente, la cefradina hidratada contiene  $\leq 100$  ppm de DMF, más preferentemente  $\leq 75$  ppm de DMF, más preferentemente  $\leq 50$  ppm de DMF, más preferentemente  $\leq 25$  ppm de DMF, incluso más preferentemente  $\leq 10$  ppm de DMF y lo más preferentemente DMF no detectable y/o la cefradina hidratada contiene  $\leq 200$  ppm de DCME, más preferentemente  $\leq 150$  ppm de DCME, más preferentemente  $\leq 100$  ppm de DCME, más preferentemente  $\leq 50$  ppm de DCME, más preferentemente  $\leq 25$  ppm de DCME, incluso más preferentemente  $\leq 10$  ppm de DCME y lo más preferentemente DCME no detectable.

50 La cefradina hidratada según la invención puede tener cualquier combinación de las propiedades (a) a (d) enumeradas anteriormente, por ejemplo, a+b o a+c o a+d o b+c o b+d o c+d, a+b+c o a+b+d o a+c+d o b+c+d o a+b+c+d. Se prefiere la composición con al menos la propiedad a: a+b o a+c o a+d o a+b+c o a+b+d o a+c+d o lo más preferido a+b+c+d.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se usó gas nitrógeno de la rejilla sin más purificación. DHPG se obtuvo de Shanghai Comfort Biochemical Co.

## EJEMPLOS

## Ejemplo comparativo

## a) Síntesis de disolución de éster metílico de D-dihidroxifenilglicina (DHPGM)

Se suspendieron 153 g de DHPG con un contenido de 99,11 % como se mide por ensayo potenciométrico y con un contenido de D-fenilglicina (PG) del 0,58 % en 280 ml de metanol y se dosificaron 121 g de ácido sulfúrico concentrado en 60 minutos (durante la dosificación la temperatura se mantuvo a 15-20 °C). La mezcla se mantuvo a reflujo durante 2 horas y se concentró a presión reducida ( $p=100$  mBar,  $T = 75-80$  °C). Entonces, se añadieron 140 ml de metanol y la mezcla se mantuvo otra vez a reflujo durante 1 hora y se concentró a presión reducida. El procedimiento se repitió otras seis veces. Finalmente, se añadieron 140 ml de metanol; la disolución se sometió a reflujo durante otra hora y se enfrió a temperatura ambiente. El pH aumentó a 2,1 con amoníaco concentrado en 15 minutos a 20 °C. Se añadieron 87 ml de agua. El metanol se destiló a presión reducida y 40-50 °C. Finalmente se obtuvieron 374 g de disolución con un pH de 2,0 y que contenía 40,87 % de DHPGM y 2,0 % de PGM.

## b) Síntesis enzimática de cefradina

Un reactor con un fondo de tamiz de 175  $\mu\text{m}$  se cargó con 37 g del mutante de PenG acilasa de *Escherichia coli* inmovilizada Phe-B24-Ala. Posteriormente se añadieron 22,3 g de 7-ADCA, 0,03 g de EDTA y 50 g de agua a 20 °C y el pH se ajustó a 7,2 con 25 % de amoníaco. Se dosificaron 46 g de la disolución de DHPGM como se obtuvo en la etapa a) (anteriormente) dentro del reactor a una velocidad constante en 180 min. El pH se mantuvo a 7,2 con amoníaco. La temperatura se mantuvo a 20 °C. Después de 60 min se añadieron 0,1 g de cefradina sólida (semilla). Después de 240 min, el pH se disminuyó a 6,0 con 25 % de ácido sulfúrico.

## c) Recuperación de cefradina

El reactor se descargó a través del tamiz del fondo con agitación ascendente. La suspensión de cefradina resultante se filtró a través de un filtro de vidrio. Las aguas madres resultantes se transfirieron de nuevo dentro del reactor. Esta secuencia de etapas se repitió cinco veces. Posteriormente, la enzima se lavó con 3 x 10 ml de agua. La torta húmeda de cefradina, las aguas madres y las aguas de lavado se combinaron, y la temperatura se disminuyó a 2 °C. El pH se disminuyó a 1,8 con 25 % de ácido sulfúrico y la disolución resultante se filtró a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . La disolución de cefradina filtrada se calentó a 48 °C, el pH se aumentó a 2,6 con amoníaco concentrado y se añadió 1,0 g de cefradina sólida (semilla). Después de 15 minutos el pH aumentó a 4,8 en 40 minutos. Posteriormente, la suspensión se agitó a 20 °C durante otros 30 min. La suspensión se filtró a través de un filtro de vidrio y la torta húmeda se lavó con 2 x 20 ml de agua y 2 x 25 ml de acetona. Después de secar, se obtuvieron 19,0 g de cefradina monohidratada con un contenido de cefalexina del 7,3 %.

Ejemplo 1

## a) General; preparación de materiales de partida

Se purificó gas nitrógeno por filtración a través de un filtro de humedad Varian CP17971 y un filtro Varian CP17970, sucesivamente. Se desgasificaron ácido sulfúrico, metanol, agua y enzimas con nitrógeno antes de uso, hasta que el contenido de oxígeno en la salida había llegado a por debajo de 100 ppm. Se usó DHPG con un contenido de PG del 1,14 %, después de 13 meses de almacenamiento. La síntesis completa se hizo en equipo cerrado y bajo nitrógeno.

## b) Síntesis de disolución de DHPGM

Se suspendieron 153 g de DHPG con un contenido de 99,11 % como se mide por ensayo potenciométrico y con un contenido de D-fenilglicina (PG) del 1,14 % en 280 ml de metanol, y la suspensión se desgasificó con nitrógeno. Se dosificaron 121 g de ácido sulfúrico concentrado en 60 minutos (durante la dosificación la temperatura se mantuvo a 15-20 °C). La mezcla se mantuvo a reflujo durante 2 horas y se concentró a presión reducida ( $p = 100$  mBar,  $T = 75-80$  °C). La rotura del vacío (aumento de presión de vacío a atmosférica) se hizo con nitrógeno. Se añadieron 140 ml de metanol y la mezcla se mantuvo otra vez a reflujo durante 1 hora y se concentró a presión reducida. El procedimiento se repitió durante otras seis veces. Finalmente, se añadieron 140 ml de metanol; la disolución se sometió a reflujo durante otra hora y se enfrió a temperatura ambiente.

El pH aumentó a 2,1 con amoníaco concentrado en 15 minutos a 20 °C. Se añadieron 87 ml de agua. El metanol se destiló a presión reducida y 40-50 °C. Finalmente se obtuvieron 374 g de disolución con un pH de 2,0, y que contenía 44,96 % de DHPGM y 0,87 % de PGM. Aparentemente, cuando la síntesis se lleva a cabo bajo nitrógeno, se forma menos PGM (0,87 %) en comparación con el ejemplo comparativo (2,00 %).

## c) Síntesis enzimática de cefradina

Un reactor con un fondo de tamiz de 175  $\mu\text{m}$  se cargó con 37 g del mutante de PenG acilasa de *Escherichia coli* inmovilizada Phe-B24-Ala. Se añadieron 22,3 g de 7-ADCA, 0,03 g de EDTA, 0,4 g de persulfato de sodio y 50 g de agua a 20 °C y la suspensión se desgasificó con nitrógeno. El pH se ajustó a 7,2 con 25 % de amoníaco.

Se dosificaron 46 g de disolución de DHPGM como se obtuvo en la etapa b) (anteriormente) dentro del reactor a una velocidad constante en 180 min. El pH se mantuvo a 7,2 con amoníaco. La temperatura se mantuvo a 20 °C. Después de 60 min se añadieron 0,1 g de cefradina sólida (semilla). Después de 240 min, el pH se redujo a 6,0 con 80 % de ácido sulfúrico.

5 *d) Recuperación de cefradina*

El reactor se descargó a través del tamiz del fondo con agitación ascendente. La suspensión de cefradina resultante se filtró a través de un filtro de vidrio. Las aguas madres resultantes se transfirieron de nuevo dentro del reactor. Esta secuencia de etapas se repitió cinco veces. Posteriormente, la enzima se lavó con 3 x 10 ml de agua. La torta húmeda de cefradina, las aguas madres y las aguas de lavado se combinaron, y la temperatura se disminuyó a 2 °C.

10 El pH se disminuyó a 1,8 con 80 % de ácido sulfúrico y la disolución resultante se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. La disolución de cefradina filtrada se calentó a 48 °C, el pH se aumentó a 2,6 con amoníaco concentrado y se añadió 1,0 g de cefradina sólida (semilla). Después de 15 minutos el pH aumentó a 4,8 en 40 minutos. Posteriormente, la suspensión se agitó a 20 °C durante otros 30 min. La suspensión se filtró a través de un filtro de vidrio y la torta húmeda se lavó con 2 x 20 ml de agua y 2 x 25 ml de acetona. Después de secar, se obtuvieron 25,6 g de cefradina monohidratada con un contenido de cefalexina del 1,74 %.

Ejemplo 2

Este experimento se hizo de la misma forma que el Ejemplo 1, pero a partir de DHPG recién preparada con un contenido de PG del 0,63 %. Al final se obtuvieron 25,6 g de cefradina monohidratada con un contenido de cefalexina del 1,03 %.

20

**REIVINDICACIONES**

1. Proceso para preparar cefradina, comprendiendo dicho proceso
- 5 a. convertir D-dihidrofenilglicina (DHPG) en una forma activada (DHPGa) que es una amida o un éster; y
- b. hacer reaccionar el ácido 7-aminodesacetoxi-cefalosporánico (7-ADCA) con D-dihidrofenilglicina en forma activada (DHPGa) en presencia de una penicilina acilasa en una mezcla de reacción acuosa para formar cefradina,
- caracterizado porque al menos la etapa (a) y la etapa (b) del proceso se llevan a cabo en condiciones anaerobias.
2. Proceso según la reivindicación 1, en el que las condiciones anaerobias se crean
- 10 a. llevando a cabo la etapa (a) y la etapa (b) del proceso en presencia de uno o más eliminadores de oxígeno;
- b. desgasificando uno o más de los materiales de partida, reactivos, disolventes y/o agua usados en la etapa (a) y la etapa (b) del proceso de la reivindicación 1;
- c. llevando a cabo la etapa (a) y la etapa (b) del proceso de la reivindicación 1 en una atmósfera que comprende un gas inerte; o
- 15 d. una combinación de a+b, a+c, b+c o a+b+c.
3. Proceso según la reivindicación 2, en el que la desgasificación se obtiene lavando el uno o más de los materiales de partida, reactivos, disolventes y agua con gas nitrógeno.
4. Proceso según la reivindicación 3, en el que la etapa (a) comprende convertir DHPG con un alcohol para formar una mezcla que comprende el éster de DHPG correspondiente.
- 20 5. Proceso según la reivindicación 4, en el que el alcohol es metanol o etanol, preferentemente metanol.
6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha reacción en la etapa (b) produce una conversión de 7-ADCA en cefradina de al menos el 70 % y en el que la concentración de DHPG en la mezcla de reacción está por debajo del 2 % en peso.
- 25 7. Proceso según la reivindicación 4, caracterizado porque el éster de DHPG formado en la etapa (a) no se aísla como un producto intermedio sólido antes de llevar a cabo la etapa (b).