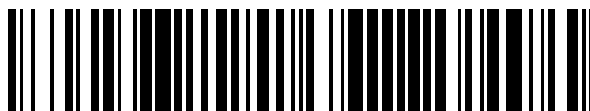


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 707**

51 Int. Cl.:

C12P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2012 PCT/EP2012/061910**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12175585**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2012 E 12733001 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2723882**

54 Título: **Proceso de preparación de cefalosporinas 3'-tiosustituidas empleando una penicilina G acilasa**

30 Prioridad:

23.06.2011 EP 11171178

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

05.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MOODY, HAROLD, MONRO;
CUSAN, CLAUDIA y
IJPEIJ, EDWIN, GERARD**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 729 707 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 preparación de cefalosporinas 3'-tiosustituidas empleando una penicilina G acilasa

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de cefalosporinas 3'-tiosustituidas por condensación enzimática de un núcleo de β -lactama 3'-tiosustituido con un derivado de fenilglicina.

Antecedentes de la invención

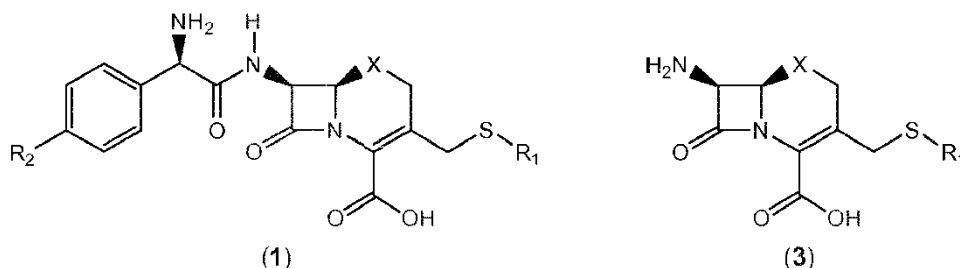
10 Se ha descrito ampliamente la producción enzimática de antibióticos β -lactámicos semisintéticos por acilación del resto amina de la β -lactama original con un derivado de ácido de la cadena lateral (por ejemplo, documentos de patente DE 2163792, DE 2621618, EP 339751, EP 473008, EP 1394262, NL 1010506, WO 1992/01061, WO 1993/12250, WO 1996/02663, WO 1996/05318, WO 1996/23796, WO 1997/04086, WO 1998/56946, WO 1999/20786, WO 2005/00367, WO 2006/069984, WO 2008/110527 y US 3.816.253). Las enzimas usadas en la materia son en la mayoría de los casos penicilina acilasas obtenidas de *Escherichia coli* y se inmovilizan sobre diversos tipos de materiales insolubles en agua (ejemplo, documento de patente WO 1997/04086).

15 Los anteriores enfoques enzimáticos sintéticos se han descrito para penicilinas semisintéticas tales como amoxicilina y ampicilina y para cefalosporinas semisintéticas tales como cefadroxilo, cefprozilo, cefalexina y cefradina. Normalmente, el último caso de cefalosporinas solo comprende ejemplos de moléculas sin sustitución en la posición 3' del núcleo de β -lactama.

20 Sin embargo, además de los compuestos mencionados anteriormente, se han desarrollado diversas cefalosporinas con el objetivo de cambiar, preferentemente mejorar, las propiedades antibacterianas. Prácticamente todos estos se han preparado, y todavía se preparan, químicamente a partir de cefalosporina C fermentativamente obtenible por introducción de grupos alternos en la posición C-3' e intercambio de la cadena lateral de aminoácido por otras cadenas laterales.

25 La introducción de alteraciones en la posición C-3' de la molécula afecta de hecho las propiedades farmacocinéticas y metabólicas y se desarrollaron muchos antibióticos satisfactorios por introducción de grupos salientes basados en tiol, tales como cefamandol, cefatrizina, cefazedona, cefazolina, cefbuperazona, cefmenoxima, cefodizima, cefonicida, cefoperazona, ceforanida, cefotiam, cefpiramida, ceftazol, ceftiofur, ceftriaxona y cefuzonam (Antibiotic and chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy, Ed. R.G. Finch, Elsevier Health Sciences, 2003, Capítulo 15 "beta-lactam antibiotics: cefalosporins" por D. Greenwood).

30 Sin embargo, la ventaja farmacocinética de introducir grupos salientes basados en tiol en la posición 3' también resulta ser un reto importante en los enfoques preparativos. En particular, esto parece ser cierto para los enfoques esquemáticos respetuosos con el medioambiente. Aunque supuestamente se usaron enzimas de *Acetobacter turbidans*, *Pseudomonas melanogenum* y *Xanthomonascitri* para la preparación de triazolmetilcefalosporinas (documento de patente US 3.899.394), Won et al. (Appl. Biochem. Biotech. 69, 1-9 (1998)) observaron que la penicilina acilasa de CFC-04017 de *Escherichia coli* estaba envenenada por trazas del grupo 2-mercapto-5-metil-1,3,4-tiadiazol (MMTD) de cefazolina. Se hicieron observaciones similares para el grupo 5-mercapto-1-metiltetrazol (MMTZ) de cefoperazona y cefpiramida y para el grupo 2,5-dihidro-3-mercapto-2-metil-5,6-dioxo-1,2,4-triazina (TTZ) de ceftriaxona durante enfoques para hidrolizar enzimáticamente un cadena lateral aminoácida (documento de patente US 6.642.020). Las observaciones anteriores se atribuyeron a la liberación de pequeñas cantidades de tiol libre, un proceso que puede ocurrir fácilmente en las circunstancias acuosas que normalmente son favorables para las reacciones enzimáticas. Y de hecho, a diferencia con las cefalosporinas mencionadas antes, no se ha informado de enfoques catalizados por penicilina acilasa sintética hacia cefalosporinas 3'-tiosustituidas económicamente atractivas, tales como los compuestos en los que se incorpora un resto D-4-hidroxi-fenilglicina



45 El documento de patente EP 1 394 262 A1 (BIOFERMA MURCIA S.A., 3 de marzo de 2004) desvela un proceso de preparación de un compuesto de la fórmula general (1), caracterizado porque se mezcla un compuesto de la fórmula general (3) con éster hidroxietílico de D-4-hidroxi-fenilglicina en presencia de una penicilina G acilasa a una temperatura de desde 0 °C hasta 40 °C y un intervalo de pH de 5,0 a 8,0.

Además, el documento de patente NL 1 010 506 C2 (DSM N.V., 9 de mayo de 2000) desvela un proceso de preparación de un compuesto de la fórmula general (1), caracterizado porque se mezcla un compuesto de la fórmula general (3) con una amida de D-4-hidroxifenilglicina N-sustituida en presencia de una penicilina G acilasa a una temperatura de desde -5 °C hasta 30 °C y un intervalo de pH de 5,5 a 9,5. Se ha demostrado que la producción del compuesto de la fórmula (1) aumenta usando la amida de D-4-hidroxifenilglicina N-sustituida en comparación con la amida de D-4-hidroxifenilglicina.

Por tanto, sigue existiendo una necesidad de preparar cefalosporinas 3'-tiosustituidas tales como las de la fórmula general (1) por condensación enzimática eficiente y respetuosa con el medioambiente de un núcleo de β -lactama 3'-tiosustituido de la fórmula general (3) con una cadena lateral apropiada.

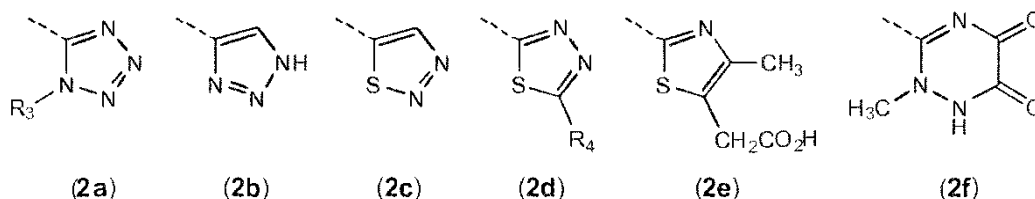
10 Descripción detallada de la invención

En el contexto de la presente invención, el término "núcleo" se define como el resto de β -lactama de una cefalosporina 3'-tiosustituida (es decir, un compuesto de la fórmula general (3)) y puede ser, por ejemplo, ácido 7-amino-3-(1,2,3-triazol-4(5)-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico o ácido 7-amino-3-(1-metil-1H-tetrazol-5-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico, o similares.

15 El término "cadena lateral" se define como el resto que, en el compuesto de β -lactama semisintético, está unido a la posición 7-amino del núcleo como se define en el presente documento, por ejemplo D-4-hidroxifenilglicina. El término "cadena lateral libre" se define como la forma de ácido de la cadena lateral, por ejemplo D-4-hidroxifenilglicina. El término "éster de cadena lateral" es la forma de éster de la cadena lateral libre por la que el grupo carboxilo de la cadena lateral libre se esterifica con un alcohol dando un éster, por ejemplo éster metílico o éster etílico de D-4-hidroxifenilglicina. El éster de cadena lateral puede estar en forma de la base libre o como una sal, por ejemplo como la sal de HCl, y el éster de cadena lateral puede estar en una forma sólida o disuelto en un disolvente adecuado.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un proceso de producción para cefalosporinas 3'-tiosustituidas, tales como cefatrizina, cefoperazona, cefpiramida o similares, o sus productos intermedios, por condensación enzimática de un núcleo con un derivado de fenilglicina seleccionado de amida de D-4-hidroxifenilglicina o un éster de D-4-hidroxifenilglicina, o amida de D-fenilglicina o un éster de D-fenilglicina.

El núcleo es un compuesto de la fórmula general (3) en la que X representa CH₂ (metileno), O (oxígeno) o S (azufre); preferentemente X representa S. El radical R₁ es preferentemente un radical de cualquiera de las fórmulas (2a), (2b), (2c), (2d), (2e) o (2f)



30 siendo R₃ CH₃, CH₂CO₂H, CH₂SO₃H, CH₂CH₂OH o CH₂CH₂N(CH₃)₂ y siendo R₄ hidrógeno o CH₃. Lo más preferentemente, el radical R₁ es (2a; R₃ = CH₃) o (2b) dando como resultado núcleos denominados ácido 7-amino-3-(1-metil-1H-tetrazol-5-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico (7-TMCA) y ácido 7-amino-3-(1,2,3-triazol-4(5)-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico (7-TACA), respectivamente.

35 El derivado de fenilglicina es preferentemente un éster tal como éster etílico de D-4-hidroxifenilglicina, éster metílico de D-4-hidroxifenilglicina, éster etílico de D-fenilglicina o éster metílico de D-fenilglicina. Alternativamente, el derivado de fenilglicina es una amida tal como amida de D-4-hidroxifenilglicina, o amida de D-fenilglicina. Lo más preferido, el derivado de fenilglicina es amida de D-4-hidroxifenilglicina, éster etílico de D-4-hidroxifenilglicina o éster metílico de D-4-hidroxifenilglicina, puesto que las cefalosporinas 3'-tiosustituidas así obtenidas tienen excelentes propiedades antibacterianas (por ejemplo, cefatrizina) y/o pueden servir de productos intermedios adecuados en la preparación de cefalosporinas con propiedades antibacterianas (por ejemplo, cefoperazona y cefpiramida).

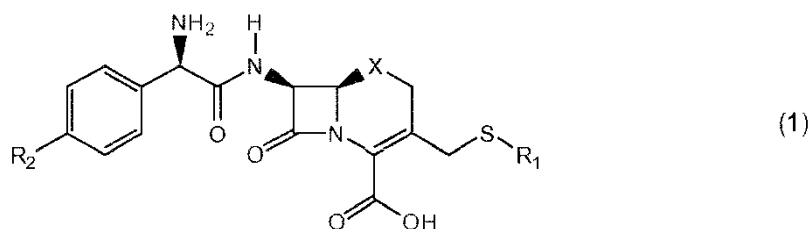
40 El derivado más preferido de fenilglicina es el éster metílico de D-4-hidroxifenilglicina. Preferentemente, el derivado de fenilglicina tiene las siguientes propiedades:

- un ee (exceso enantiomérico) preferentemente igual o superior a 90 %, más preferentemente igual o superior a 95 %, preferentemente igual o superior a 96 %, preferentemente igual o superior a 97 %, preferentemente igual o superior a 98 % y lo más preferentemente igual o superior a 99 %; y
- un contenido de sal preferentemente de 20 % en moles o menos, más preferentemente de 10 % en moles o menos, más preferentemente de 5 % en moles o menos, más preferentemente de 2 % en moles o menos, lo más preferentemente de 1 % en moles o menos, expresado como moles de sal con respecto a moles de éster.

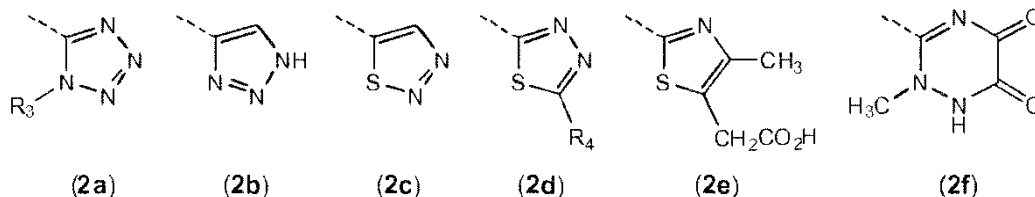
Será evidente para el experto que un éster en la forma de base libre es una condición de que puede tener cualquier valor de ee enumerado en combinación con cualquier valor de contenido de sal enumerado.

5 La enzima usada para la condensación enzimática es convenientemente una enzima adecuada para reconocer como sustrato amidas o ésteres de α -aminoácidos tales como dihidrofenilglicina, 4-hidroxifenilglicina y fenilglicina, concretamente penicilina G acilasas. En una realización preferida se encontró que las penicilina G acilasas mutantes como se describen en el documento de patente WO 2010/072765 son muy aptas para la síntesis de cefalosporinas 3'-sustituidas, puesto que se generan cantidades relativamente bajas de tioles no deseados. Preferentemente, la enzima se inmoviliza para facilitar la separación del medio de reacción y la recuperación para uso repetido. La inmovilización se puede llevar a cabo usando una multitud de materiales de soporte tales como sílice o soportes basados en gelatina.

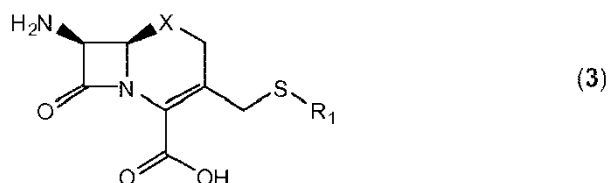
10 En un primer aspecto de la invención se proporciona un proceso para la preparación de un compuesto de la fórmula general (1)



15 en la que R_1 es un radical de la fórmula (2a), (2b), (2c), (2d), (2e) o (2f), siendo R_3 CH_3 , $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ o $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ y siendo R_4 hidrógeno o CH_3



y en las que R_2 es H u OH y X es CH_2 , O o S, caracterizado porque se mezcla un compuesto de la fórmula general (3) o una sal del mismo en la que R_1 y X son como se han definido anteriormente



20 con amida de D-4-hidroxifenilglicina o un éster de D-4-hidroxifenilglicina o amida de D-fenilglicina o un éster de D-fenilglicina en presencia de una penicilina G acilasa a una temperatura de desde $-5\text{ }^\circ\text{C}$ hasta $20\text{ }^\circ\text{C}$ y un intervalo de pH de 8,4 a 9,1.

25 La reacción se puede llevar a cabo en un amplio intervalo de temperatura, es decir, $-5\text{ }^\circ\text{C}$ a $20\text{ }^\circ\text{C}$, ya que el equilibrio entre la velocidad de reacción, tasa de degradación y conversión óptima se ajusta mejor dentro de este intervalo. Se encontró que el intervalo de temperatura más óptimo, donde se obtienen altas conversiones en combinación con baja degradación de producto, era desde $0\text{ }^\circ\text{C}$ hasta $10\text{ }^\circ\text{C}$.

30 El pH al que se lleva a cabo la reacción es desde 8,4 hasta 9,1. Se encontró que el intervalo de pH más óptimo, donde se obtienen altas conversiones en combinación con baja degradación de producto, era desde 8,5 hasta 9,0. Se encontró que es ventajoso cuando el intervalo de pH es desde 8,8 hasta 9,2 en los primeros 10 a 100 min de la reacción, donde posteriormente se mantiene el pH en el intervalo de 8,5 a 8,8. Este enfoque facilita la rápida disolución de material de partida, por una parte, mientras que limita, por otra parte, la formación de productos secundarios, tales como cadena lateral libre y tioles. Se encontró que se obtienen las conversiones más altas cuando el núcleo de partida se disuelve en la mezcla de reacción.

35 Se encontró que la combinación de un intervalo de temperatura de reacción de $0\text{ }^\circ\text{C}$ a $5\text{ }^\circ\text{C}$ y un intervalo de pH de 8,4 a 9,1 es la más preferida para obtener el mayor rendimiento y las menores reacciones secundarias, tales como la formación de tioles. Es inesperado el hecho de que se obtengan resultados favorables en este intervalo de pH, ya que se conocen bien las β -lactamas por su inestabilidad a intervalos de pH básicos, un hecho que se confirma en el

documento de patente EP 1394262 donde se propone un intervalo de pH de 5,0 - 8,0. Un intervalo de temperatura todavía más preferido es 2 °C a 4 °C combinado con un intervalo de pH de 8,6 a 8,8.

Se pueden mantener los valores de pH mediante la adición de base durante el transcurso de la reacción enzimática. Las bases adecuadas son amoniaco, hidróxido potásico acuoso e hidróxido sódico acuoso. Se encontró que el hidróxido sódico acuoso da resultados superiores en comparación con el amoniaco en términos de formación conjunta de tioles no deseados. A diferencia del amoniaco, los hidróxidos alcalinotérreos, tales como hidróxido de litio acuoso, hidróxido potásico o hidróxido sódico, redujeron sorprendentemente la formación conjunta de tioles no deseados hasta casi despreciable. Preferentemente, la concentración de hidróxido alcalinotérreo es desde 1 M hasta 10 M. El experto apreciará que el extremo inferior de este intervalo puede ser inferior al óptimo en términos de volumen, mientras que el extremo superior plantea el riesgo de formación de los denominados 'puntos calientes', que pueden ser perjudiciales para la enzima y β -lactama. Así, un intervalo de concentración de hidróxido alcalinotérreo más preferible es desde 2 M hasta 8 M, lo más preferentemente desde 3 M hasta 6 M.

Se puede realizar la adición de la amida o éster de la cadena lateral, amida de D-4-hidroxifenilglicina o un éster de D-4-hidroxifenilglicina o amida de D-fenilglicina o un éster de D-fenilglicina, mediante la adición de dicha amida o éster de la cadena lateral como un sólido o disuelto. Cuando se disuelve, esto es preferentemente en agua en la que la disolución resultante se lleva a pH bajo con un ácido tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico. En una realización preferida, se disuelve un éster de la cadena lateral y se añade la disolución resultante a la mezcla de reacción durante un cierto intervalo de tiempo. Opcionalmente, se añade el éster de la cadena lateral como se describe en los documentos de patente WO 2008/110527 y WO 2008/110529. Dicho intervalo de tiempo puede ser desde 10 hasta 300 min, preferentemente desde 30 hasta 200 min, lo más preferentemente desde 60 hasta 180 min.

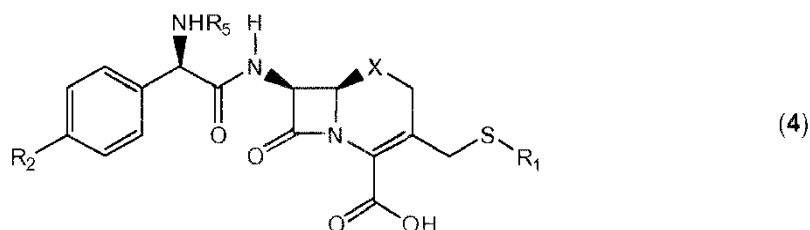
Cuando la reacción de acoplamiento enzimático ha alcanzado el grado deseado de conversión, se recupera la cefalosporina 3'-tiosustituída de la fórmula general (1) usando métodos conocidos, normalmente siguiendo reducción del pH hasta un valor entre 1,5 y 6,5. Por ejemplo, se puede usar un reactor que está equipado con un tamiz en el compartimento inferior y una salida en el fondo. El contenido del reactor se puede entonces descargar a través del tamiz, preferentemente usando agitación ascendente. La suspensión resultante de cefalosporinas 3'-tiosustituídas, libre de enzima inmovilizada, se puede entonces filtrar o centrifugar. Debido a la baja cantidad de cadena lateral libre presente después de la reacción de acoplamiento enzimático, se puede llevar a cabo la cristalización de la cefalosporina 3'-tiosustituída final a altas concentraciones de la cefalosporina 3'-tiosustituída que da como resultado altos rendimientos.

En una realización no limitante a modo de ejemplo, donde el núcleo de partida es (3) siendo R_1 (2a; $R_3 = CH_3$), siendo R_2 OH y siendo X S, el aislamiento del producto (1) correspondiente incluye la retirada de enzima inmovilizada por filtración, precipitación del producto por reducción del pH con ácido sulfúrico acuoso, preferentemente hasta un valor de 2,5 a 6, retirada de aproximadamente 80 % de agua por filtración, dilución de la suspensión resultante con metanol y filtración a sequedad. Opcionalmente, se puede aplicar una etapa de lavado adicional con metanol. De esta forma, se puede aislar producto (1) como un sólido manejable estable con 94 % de rendimiento, y con alta calidad. Sorprendentemente, se encontró que cuando no se añadía metanol durante la filtración, el producto se convertía en una goma pegajosa o arcilla. Lo anterior es aplicable a diversos disolventes orgánicos. Los disolventes preferidos son alcoholes y cetonas tales como acetona, etanol o metanol. En principio se puede añadir el disolvente orgánico a la suspensión antes de la filtración, pero en este caso las impurezas presentes en la mezcla (tales como éster metílico de D-4-hidroxifenilglicina, D-4-hidroxifenilglicina y/o 7-TMCA) pierden solubilidad y pueden contaminar el producto final. Por consiguiente, se prefiere añadir el alcohol o cetona después de que se haya retirado 50-90 % del líquido de la suspensión por filtración. El producto de la reacción (1) donde R_1 es (2a; $R_3 = CH_3$), R_2 es OH y X es S se aísla en una forma cristalina que es novedosa como resultado de las condiciones de reacción enzimáticas hasta ahora no vistas y etapas de procesamiento aguas abajo. Ventajosamente, esta forma cristalina es altamente estable y pura, que la hace un excelente material de partida para la producción de alto rendimiento y de alta pureza de tanto cefoperazona como cefpiramida. El espectro de XRD de la forma cristalina muestra picos principales a valores 2θ de $13,9 \pm 0,3$, $15,6 \pm 0,3$, $19,1 \pm 0,3$, $19,9 \pm 0,3$, $22,4 \pm 0,3$, $23,2 \pm 0,3$, $24,8 \pm 0,3$, $28,1 \pm 0,3$, $29,0 \pm 0,3$, $32,2 \pm 0,3$, $33,9 \pm 0,3$, $38,6 \pm 0,3$ y $48,8 \pm 0,3$. Preferentemente, la intensidad de cualquiera de dichos picos principales es superior a 10 % de la intensidad del más intenso de dichos picos principales.

Un enfoque similar es aplicable a los compuestos de partida (3) en los que R_1 es (2b), (2c), (2d), (2e) o (2f). Cuando R_1 es (2b), R_2 es OH y X es S, el procedimiento anterior da como resultado el antibiótico cefatrizina y el producto así obtenido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede usar para la fabricación de un medicamento.

Opcionalmente, y esto puede ser útil en caso de que la cefalosporina 3'-tiosustituída obtenida después del acoplamiento enzimático se modifique en una reacción posterior tal como la brevemente expuesta a continuación, la cefalosporina 3'-tiosustituída ni se aísla y/o ni cristaliza.

En otra realización más, el producto (1) obtenido por el proceso del primer aspecto descrito anteriormente se hace reaccionar adicionalmente para dar un producto farmacéutico deseado de la fórmula general (4).



- 5 en la que R₁, R₂ y X son como se han descrito anteriormente y R₅ es un radical elegido de la lista que consiste en 4-etil-2,3-dioxo-1-piperazincarboxilo, 4-hidroxi-6-metil-nicotinilo (o la forma ceto correspondiente 6-metil-4-oxo-1,4-dihidropiridina-3-carboxilo), ácido 1*H*-imidazol-4-carboxil-5-carboxílico o derivados tales como amidas, éteres y sus ésteres. Preferentemente, R₁ es un radical de la fórmula (2a) siendo R₃ CH₃, siendo R₂ OH, siendo X S y siendo R₅ 4-etil-2,3-dioxo-1-piperazincarboxilo o 4-hidroxi-6-metil-nicotinilo.

10 Dicha reacción adicional comprende preferentemente la modificación del grupo amino de la cadena lateral, por ejemplo por reacción con un haluro de ácido en agua/acetato de etilo con carbonato de potasio, tal como se describe en el documento de patente DE 2600880. Después de la formación y el aislamiento opcional de la cefoperazona resultante, el producto se puede convertir en una sal farmacéuticamente aceptable, preferentemente la sal de sodio, por ejemplo por reacción con una sal de sodio inorgánica tal como hidrogenocarbonato de sodio.

15 Cuando, en lugar del cloruro de 4-etil-2,3-dioxo-1-piperazincarboxilo mencionado anteriormente, se usa un derivado activado de ácido 4-hidroxi-6-metil-nicotínico (o la forma ceto correspondiente ácido 6-metil-4-oxo-1,4-dihidropiridin-3-carboxílico), la secuencia de reacción da como resultado el antibiótico cefpiramida.

- 15 Los productos obtenidos por los procesos del primer aspecto, en particular cefatrizina, cefoperazona y cefpiramida, se usan para la fabricación de un medicamento con propiedades antibacterianas. Los medicamentos así obtenidos tienen la ventaja de ser producidos con alta pureza y con baja carga medioambiental en comparación con sus congéneres que se sintetizan químicamente.

Leyendas de las figuras

- 20 La Figura 1 es el patrón de difracción de rayos X de polvo registrado del compuesto de la fórmula (1) en la que R₁ es un radical de la fórmula (2a) siendo R₃ CH₃ y en la que R₂ es OH y X es S después del almacenamiento en condiciones ambientales durante 2,5 h. Eje x: valor 2-theta (°). Eje y: intensidad (cps). Se pueden diferenciar los siguientes picos distintos:

Angulo 2-theta (°)	Valor d (Å)	Recuentos de intensidad
5,270	16,75541	95,4
5,355	16,49094	134
6,854	12,88602	119
7,180	12,30269	123
8,886	9,94325	259
9,451	9,35066	207
11,418	7,74356	128
12,340	7,16701	218
12,878	6,86899	411
13,905	6,36370	1479
14,254	6,20847	486
15,153	5,84215	107
15,614	5,67081	856
16,828	5,26434	464
19,059	4,65272	3026

ES 2 729 707 T3

Ángulo 2-theta (°)	Valor d (Å)	Recuentos de intensidad
19,907	4,45640	538
20,686	4,29035	92,8
21,545	4,12123	45,6
22,404	3,96511	597
23,182	3,83372	626
23,682	3,75394	89,6
24,162	3,68048	91,2
24,785	3,58938	700
25,618	3,47444	201
26,634	3,34425	299
27,644	3,22426	144
28,053	3,17816	1583
28,749	3,10279	305
29,010	3,07548	1186
29,377	3,03792	278
29,620	3,01352	205
30,331	2,94449	127
31,423	2,84457	178
32,145	2,78231	3879
32,777	2,73013	108
33,868	2,64461	1968
34,846	2,57261	181
35,627	2,51799	60,3
36,794	2,44076	91,4
37,939	2,36970	75,2
38,367	2,34422	209
38,638	2,32842	904
38,966	2,30957	115
40,479	2,22667	93,3
40,778	2,21102	152
41,381	2,18019	84,9
42,339	2,13306	58,2
43,132	2,09565	44,5
46,644	1,94571	32,6

Ángulo 2-theta (°)	Valor d (Å)	Recuentos de intensidad
47,351	1,91828	108
48,029	1,89277	143
48,797	1,86475	1064
49,467	1,84106	185
49,804	1,82938	39,0
50,689	1,79953	139
53,161	1,72150	43,1
54,574	1,68024	389
55,217	1,66218	276
57,351	1,60530	188
57,961	1,58984	71,4
58,267	1,58222	44,2
58,774	1,56979	34,5
59,486	1,55268	366

La Figura 2 es el patrón de difracción de rayos X de polvo registrado del compuesto de la fórmula (1) en la que R₁ es un radical de la fórmula (2a) siendo R₃ CH₃ y en la que R₂ es OH y X es S antes del almacenamiento en condiciones ambientales durante 2,5 h. Eje x: valor 2-theta (°). Eje y: intensidad (cps). Los picos discernibles son los mismos que en la Figura 1, sin embargo también hay un máximo ancho a 2θ ~ 27.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de penicilina acilasa inmovilizada

Se pueden llevar a cabo la producción, aislamiento y purificación de penicilina G acilasas no mutantes y mutantes como se describe en los documentos de patente WO 1996/005318 y WO 2003/055998. Alternativamente, se pueden obtener por síntesis génica genes que codifican penicilina G acilasas mutantes. Se logró la producción de la penicilina G acilasa mutante clonando los genes que codifican penicilina G acilasas mutantes en un vector de expresión apropiado, transformando un hospedador adecuado tal como *Escherichia coli* con dicho vector y cultivando el hospedador transformado en condiciones adecuadas para la producción de las penicilina G acilasas mutantes y la recuperación y purificación de los mutantes se llevó a cabo como se describe en el documento de patente WO 2010/072765. Se inmovilizaron la penicilina G acilasa AA (la penicilina G acilasa no mutante de *Escherichia coli* con mutaciones B:F24A y B:V148L) y la penicilina G acilasa mutante 1 (la penicilina G acilasa no mutante de *Escherichia coli* con las mutaciones V11A, A:S3L, A:V192E, B:F24A, B:V148L y B:F460L) como se desvela en el Ejemplo 1 del documento de patente WO 2010/072765 según el método desvelado en los documentos de patente EP 839192 y EP 222462.

HPLC analítica

Se siguieron las reacciones por análisis de HPLC cuantitativa. Se calcularon los factores de retención de 7-TMCA, HPGM, HPG, 7-TACA y 5-mercapto-1-metiltetrazol usando patrones; se dedujo el factor de retención de ácido D-7-(4-hidroxifenilacetamido)-3-(1-metil-1H-tetrazol-5-il)tiometilcefem-4-carboxílico basándose en el balance de masas en los primeros experimentos y posteriormente se calculó usando un patrón; se dedujo del balance de masas el factor de retención de cefatrizina.

Instrumento: HPLC Hewlett Packard 1100, detección a 220 nm

Columna: Intersil ODS-3, 5 µm 4,6 x 150 mm C/N 5020-01731

Flujo: 1 ml/min, tiempo de parada 37 min

Método: Eluyente A: KH₂PO₃ (5,44 g) y 6 ml de H₃PO₄ 1 M, hasta 2 l con agua MilliQ

Eluyente B: MeOH

Eluyente C: acetonitrilo

Gradiente:

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)	Eluyente C (%)
0	98,5	0,5	1
2,5	96	3	1
11	74	25	1
15	59	40	1
25	39	60	1
28	19	80	1
32	19	80	1
32,1	98,5	0,5	1
37	98,5	0,5	1

5 Medición de valores de pH

Se midieron los valores de pH citados en la presente invención del siguiente modo.

La medición se realiza usando 718 STAT Titrimo de Metrohm. El electrodo de pH es de Metrohm, número de serie 6.0234.110. Contiene KCl 3 M. La calibración del pH-metro se realiza a 20 °C a pH 4 y pH 7 usando disoluciones patrón de Merck, usando el programa de calibración presente en el instrumento.

10 Mediciones de XRD

Se realizaron experimentos de difracción de rayos X de polvo usando un difractómetro BRUKER D8 ADVANCE usando portamuestras estándar con placa de Si para minimizar la señal de ruido de fondo; intervalo de barrido $5^\circ < 2\theta < 60^\circ$, rotación de la muestra 30 rpm, 0,3 s/etapa, $0,00745^\circ/\text{etapa}$, ranura de divergencia establecida a $0,3^\circ$; todas las condiciones de medición se fijan en el archivo de control del instrumento CAMBRIDGE.DQL; además de las mediciones de muestra, se mide la muestra de referencia de corindón A13-B73 según las condiciones brevemente expuestas en la sección "calibrado del instrumento" del manual de BRUKER.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

20 Preparación enzimática de ácido D-7-(4-hidroxifenilacetamido)-3-(1-metil-1H-tetrazol-5-il)tiometilcefem-4-carboxílico

Ejemplo 1a

Se añadió ácido 7-amino-3-(1-metil-1H-tetrazol-5-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico (7-TMCA; 5 g) a agua destilada (38 g) y se enfrió hasta 3 °C. Se agitó la mezcla a 400 rpm y el pH se llevó a 9,0 con NaOH acuoso (5 M), tras lo cual el resto de la reacción se llevó a cabo a pH 8,8. Después de 60-80 min, se filtró la suspensión. El filtrado, que contenía 4,1 g de 7-TMCA, se dispuso de nuevo en el reactor y se añadió penicilina G acilasa mutante 1 inmovilizada (3,5 g, véase Materiales y métodos) y a la mezcla resultante se añadió gota a gota a velocidad de 7 ml/h una disolución de éster metílico de D-4-hidroxifenilglicina (HPGM) por una bomba de jeringa (tiempo de dosificación 2 h). Esta disolución se preparó disolviendo HPGM (4,0 g, 1,7 equiv.) en agua (6,4 g) y H₂SO₄ al 25 % (4,25 g en agua). La reacción enzimática se siguió por HPLC analítica (véase Materiales y métodos) y se detuvo al final de la adición de HPGM, por filtración enzimática. La conversión fue 98 % (con respecto a 7-TMCA). La mezcla contuvo 1,1 % (p/p) de D-4-hidroxifenilglicina (HPG), 0,1 % (p/p) de 7-TMCA, 1,0 % (p/p) de HPGM, 7,9 % (p/p) del compuesto del título y 0,07 % (p/p) de 5-mercapto-1-metiltetrazol. En el cromatograma de HPLC fueron visibles dos impurezas no secundarias identificadas con <1 % de porcentaje de área de HPLC.

Al final de la reacción enzimática, la enzima se retiró por filtración sobre filtro de vidrio N° 1 dando 65 g de filtrado a pH 8,8. Con agitación vigorosa a 3 °C se añadió una disolución acuosa al 25 % de H₂SO₄ (2,70 g) en 10 min dando un pH de 5,7. La suspensión obtenida se agitó durante 10 min a 3 °C y luego se filtró a vacío sobre filtro de vidrio

Nº 3. Cuando se retiró 60 % del volumen por filtración (se recuperaron 40 g de aguas madre), se añadió MeOH (14 g) a la suspensión restante sobre el filtro y la mezcla de disolventes se retiró completamente por filtración. Se lavó el sólido final con MeOH (15 g). El producto del título se recuperó con un rendimiento de 90 % basado en el material de partida 7-TMCA. Basándose en el análisis de HPLC, la mezcla contuvo 0,08 % de HPG, 0,63 % de HPGM, 0,41 % de 7-TMCA y 98,88 % del compuesto del título (datos basados en el porcentaje de área de HPLC). RMN ¹H (2 % de DCI en D₂O a 300K, en RMN de 700 MHz). Los valores se dan en ppm, usando TMS como referencia interna: 3,5 - 3,7 (dd, 2H), 4,05 (s, 3H), 4,1 - 4,3 (dd, 2H), 5,1 (d, 1H), 5,25 (s, 1H), 5,7 (d, 1H), 7,0 (d, 2H), 7,4 (d, 2H). Para XRD véase la Figura 1.

Ejemplo 1b: como el Ejemplo 1a con las siguientes diferencias: la reacción se valoró usando hidróxido sódico 1 M y se realizó el procesamiento corriente abajo sin MeOH. La conversión fue 93 % (con respecto a 7-TMCA). La mezcla contuvo 0,75 % (p/p) de HPG, 0,3 % (p/p) de 7-TMCA, 0,2 % (p/p) de HPGM, 6,6 % (p/p) del compuesto del título y 0,13 % (p/p) de 5-mercapto-1-metiltetrazol. En el cromatograma de HPLC fueron visibles dos impurezas secundarias no identificadas con <1 % de porcentaje de área de HPLC. Al final de la reacción enzimática, la enzima se retiró por filtración sobre filtro de vidrio Nº 1 dando 81 g de filtrado a pH 8,6. Con agitación vigorosa a 3 °C se añadió una disolución acuosa al 25 % de H₂SO₄ (1,6 g) en 10 min dando un pH de 7,0. Durante esta operación, precipitó un sólido blanco y se aisló después de que la morfología se convirtiera en una goma marrón.

Ejemplo 1c: como el Ejemplo 1b con las siguientes diferencias: se añadió HPGM como un sólido durante la reacción y la reacción se realizó a pH 8,7.

Después de 240 min, la conversión fue 67 % (con respecto a 7-TMCA). La mezcla contuvo 0,43 % (p/p) de HPG, 1,6 % (p/p) de 7-TMCA, 0,12 % (p/p) de HPGM, 6,1 % (p/p) del compuesto del título y 0,12 % (p/p) de 5-mercapto-1-metiltetrazol.

Ejemplo 1d: como el Ejemplo 1c con la siguiente diferencia: la reacción se valoró usando amoniaco al 25 % en agua.

Después de 240 min, la conversión fue 63 % (con respecto a 7-TMCA). La mezcla contuvo 0,34 % (p/p) de HPG, 3,04 % (p/p) de 7-TMCA, 0,14 % (p/p) de HPGM, 6,1 % (p/p) del compuesto del título y 0,23 % (p/p) de 5-mercapto-1-metiltetrazol.

Ejemplo 1e: como se describe en el Ejemplo 1a con las siguientes diferencias: la reacción se valoró usando amoniaco al 25 % en agua a pH 8,8 y el procesamiento corriente abajo se llevó a cabo sin MeOH.

La conversión fue 96 % (con respecto a 7-TMCA). La mezcla contuvo 0,88 % (p/p) de HPG, 0,26 % (p/p) de 7-TMCA, 0,16 % (p/p) de HPGM, 7,14 % (p/p) del compuesto del título y 0,9 % (p/p) de 5-mercapto-1-metiltetrazol. En el cromatograma de HPLC fueron visibles dos impurezas secundarias no identificadas con <1 % de porcentaje de área de HPLC. Al final de la reacción enzimática, la enzima se retiró por filtración sobre filtro de vidrio Nº 1 dando 65 g de filtrado a pH 8,8. Con agitación vigorosa a 3 °C se añadió una disolución acuosa al 25 % de H₂SO₄ (3,52 g) en 10 min dando un pH de 4,0. Durante esta operación, precipitó un sólido blanco y se aisló después de que la morfología se convirtiera en una goma marrón.

Ejemplo 1f (comparativo): como el Ejemplo 1e con las siguientes diferencias: la reacción se realizó a pH 7,2 y 18 °C y se aplicó filtración en el procesamiento corriente abajo al mismo pH.

Después de 3 h la conversión fue 81 % (con respecto a 7-TMCA). La mezcla contuvo 1,05 % (p/p) de HPG, 0,78 % (p/p) de 7-TMCA, 0,02 % (p/p) de HPGM, 6,4 % (p/p) del compuesto del título y no se cuantificó cantidad de 5-mercapto-1-metiltetrazol. En el cromatograma de HPLC fueron visibles dos impurezas secundarias no identificadas con <1 % de porcentaje de área de HPLC. Al final de la reacción enzimática, la enzima se retiró por filtración sobre filtro de vidrio Nº 1 dando un sólido que presentaba 95 % de porcentaje de área del producto deseado y 5 % de porcentaje de área del material de partida 7-TMCA. El análisis de RMN de esta muestra indicó una pureza del producto de 83,7 %, con 6,8 % de 7-TMCA presente.

Ejemplo 1g (comparativo): como el Ejemplo 1d con la siguiente diferencia: se añadió HPGM como un sólido al principio de la reacción enzimática, que se llevó a cabo a 10 °C y pH desde 8,2 hasta 7,7.

Después de 245 min, la conversión fue 88 % (con respecto a 7-TMCA). La mezcla contuvo 0,77 % (p/p) de HPG, 0,66 % (p/p) de 7-TMCA, 0,76 % (p/p) de HPGM, 10,77 % (p/p) del compuesto del título y no se cuantificó cantidad (p/p) de 5-mercapto-1-metiltetrazol. La relación S/H fue 9,4.

Ejemplo 1h (comparativo): como el Ejemplo 1g, usando penicilina G acilasa AA inmovilizada en lugar de penicilina G acilasa mutante 1 inmovilizada.

Después de 295 min, la conversión fue 72 % (con respecto a 7-TMCA). La mezcla contuvo 0,18 % (p/p) de HPG, 2,03 % (p/p) de 7-TMCA, 2,51 % (p/p) de HPGM, 8,56 % (p/p) del compuesto del título y no se cuantificó cantidad (p/p) de 5-mercapto-1-metiltetrazol. La relación S/H fue 18.

Ejemplo 1i (comparativo): como el Ejemplo 1g con la siguiente diferencia: se añadió HPGM como disolución durante la reacción.

Después de 180 min, la conversión fue 95 % (con respecto a 7-TMCA). La mezcla contuvo 0,89 % (p/p) de HPG, 0,35 % (p/p) de 7-TMCA, 0,16 % (p/p) de HPGM, 10,43 % (p/p) del compuesto del título y no se cuantificó cantidad (p/p) de 5-mercapto-1-metiltetrazol. La relación S/H fue 4,1.

Ejemplo 1j: como el Ejemplo 1a con las siguientes diferencias: la reacción se valoró usando NaOH 10 M y el producto se aisló desde pH 2,72.

La conversión fue 98 % (con respecto a 7-TMCA). La mezcla contuvo 1,12 % (p/p) de HPG, 0,12 % (p/p) de 7-TMCA, 1,18 % (p/p) de HPGM, 8,9 % (p/p) del compuesto del título y 0,04 % (p/p) de 5-mercapto-1-metiltetrazol. En el cromatograma de HPLC fueron visibles dos impurezas secundarias no identificadas con <1 % de porcentaje de área de HPLC. Al final de la reacción enzimática, la enzima se retiró por filtración sobre filtro de vidrio N° 1 dando 59 g de filtrado a pH 8,8. Con agitación vigorosa a 3 °C se añadió una disolución acuosa al 25 % de H₂SO₄ en 5 min dando un pH de 2,72. La suspensión resultante se diluyó con el mismo volumen de MeOH y entonces el producto se recuperó por filtración. Basándose en el análisis de HPLC, la mezcla contuvo 3,8 % de HPG, 2,9 % de HPGM, 0,51 % de 7-TMCA y 92,7 % del compuesto del título (datos basados en el porcentaje de área de HPLC).

Ejemplo 1k: como el Ejemplo 1j, añadiendo acetona durante el proceso corriente abajo en lugar de MeOH.

Al final de la reacción enzimática, la enzima se retiró por filtración sobre filtro de vidrio N° 1 dando 59 g de filtrado a pH 8,8. Con agitación vigorosa a 3 °C se añadió una disolución acuosa al 25 % de H₂SO₄ en 5 min dando un pH de 2,72. La suspensión resultante se diluyó con el mismo volumen de acetona y entonces el producto se recuperó por filtración. Basándose en el análisis de HPLC, la mezcla contuvo 4,3 % de HPG, 2,3 % de HPGM, 0,51 % de 7-TMCA, 0,5 % de 5-mercapto-1-metiltetrazol y 92,1 % del compuesto del título (datos basados en el porcentaje de área de HPLC).

Ejemplo 1l: como el Ejemplo 1j con las siguientes diferencias: la reacción se realizó a pH 8,5 y se añadió MeOH al principio del procesamiento corriente abajo.

La conversión fue 97 % (con respecto a 7-TMCA). La mezcla contuvo 1,44 % (p/p) de HPG, 0,11 % (p/p) de 7-TMCA, 0,85 % (p/p) de HPGM, 8,2 % (p/p) del compuesto del título y 0,11 % (p/p) de 5-mercapto-1-metiltetrazol. En el cromatograma de HPLC fueron visibles dos impurezas secundarias no identificadas con <1 % de porcentaje de área de HPLC. Al final de la reacción enzimática, la enzima se retiró por filtración sobre filtro de vidrio N° 1 dando 63 g de filtrado a pH 8,5. Con agitación vigorosa a 3 °C, se añadió la misma cantidad de MeOH, seguido por 25 % de disolución acuosa de H₂SO₄ dando un pH de 2,78. La mezcla recuperada por filtración contuvo 0,2 % de HPG, 1,5 % de HPGM, 0,3 % de 7-TMCA y 98,5 % del compuesto del título (datos basados en el porcentaje de área de HPLC).

Ejemplo 1m: como el Ejemplo 1l con las siguientes diferencias: durante el procesamiento corriente abajo el compuesto se precipitó a pH 4,8 y se usó acetona durante la filtración en lugar de MeOH.

La conversión fue 94 % (con respecto a 7-TMCA). La mezcla contuvo 0,64 % (p/p) de HPG, 0,36 % (p/p) de 7-TMCA, 0,64 % (p/p) de HPGM, 8,37 % (p/p) del compuesto del título y 0,03 % (p/p) de 5-mercapto-1-metiltetrazol. En el cromatograma de HPLC fueron visibles dos impurezas secundarias no identificadas con <1 % de porcentaje de área de HPLC. Al final de la reacción enzimática, la enzima se retiró por filtración sobre filtro de vidrio N° 1 dando 59 g de filtrado a pH 8,6. Con agitación vigorosa a 3 °C, se añadieron 5 g de acetona y el pH disminuyó hasta 4,8 mediante la adición gota a gota de 2,3 g de H₂SO₄ al 25 % en agua a 3 °C. La mezcla se diluyó con 5 g adicionales de acetona y luego se filtró. Por HPLC, el sólido sobre el filtro mostró 93,5 % de ABC, 2,8 % de HPG, 2,5 % de HPGM y 1,6 % de 7-TMCA de porcentaje de área. En las aguas madres se detectó aproximadamente 50 % del producto. Por tanto, el sólido se mezcló con las aguas madres y se diluyó con 100 g de MeOH. Después de la filtración, se recuperó 73 % del producto por filtración. Basándose en el análisis de HPLC, la mezcla contuvo 0,2 % de HPG, 1,5 % de HPGM, 0,3 % de 7-TMCA y 98,5 % del compuesto del título (datos basados en el porcentaje de área de HPLC).

Ejemplo 2 (comparativo) Degradación de 7-TMCA

Durante los experimentos de condensación enzimática, 7-TMCA experimentó degradación química, que ocurrió también en ausencia de enzima, fue más rápida a pH básico y a concentración alta de 7-TMCA. El producto de degradación fue el principal producto secundario formado durante la reacción enzimática y se identificó en el análisis de masa que era 5-mercapto-1-metiltetrazol. La degradación química ocurrió usando amoníaco acuoso (25 %) para la valoración, pero fue despreciable cuando se aplicó NaOH acuoso (1 o 5 o 10 M). Específicamente, la cantidad de 5-mercapto-1-metiltetrazol no fue detectable durante la etapa de disolución usando NaOH acuoso 5 M y 0,05 % (p/p) y al final de la reacción enzimática; 0,01 % (p/p) y 0,24 % (p/p) durante la etapa de disolución y al final de la reacción enzimática, respectivamente, usando amoníaco acuoso (25 %) en las mismas condiciones de reacción, o mayor en condiciones de reacción diferentes.

Ejemplo 3 (comparativo) Degradación de HPGM

5 Durante la condensación enzimática de 7-TMCA y HPGM, se hidrolizó el último compuesto dando HPG. Como se demuestra a continuación, la formación de HPG fue debida a hidrólisis enzimática y no química, en las condiciones experimentales aplicadas. Se iniciaron dos reacciones en paralelo a 2 °C. En ambas, se mezcló agua (40 g) de pH 8,7 con una disolución de HPGM (0,5 ml en H₂SO₄ acuoso, que es comparable con la concentración de HPGM presente durante las reacciones enzimáticas). En uno de los reactores se añadió penicilina G acilasa mutante 1 inmovilizada (5 g) y se monitorizaron las dos reacciones por HPLC analítica. En el plazo de 5 min, HPGM se convirtió completamente en HPG por la enzima, mientras que en el blanco químico no se registró HPG en el plazo de 2 h y solo se hidrolizó 9 % de HPGM en 20 h.

10 Ejemplo 4 (se encuentra fuera del alcance de la invención) Cefoperazona libre de ácido

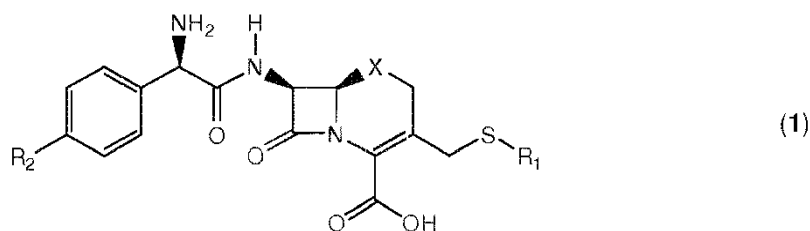
15 Se suspendió ácido D-7-(4-hidroxifenilacetamido)-3-(1-metil-1H-tetrazol-5-il)tiometilcefem-4-carboxílico (500 mg) a temperatura ambiente en agua (10 ml). Después de la adición de carbonato de potasio (230 mg, 1,5 equiv.), la suspensión se volvió una disolución transparente. A esta mezcla se añadieron acetato de etilo (5 ml) y cloruro de etil-2,3-dioxo-1-piperazincarbonilo (210 mg, 1 equiv.). Después de agitar durante la noche, la reacción se analizó por HPLC analítica mostrando el 42 % del producto deseado cefoperazona basándose en el material de partida.

Ejemplo 5 (comparativo) Preparación enzimática de cefatrizina

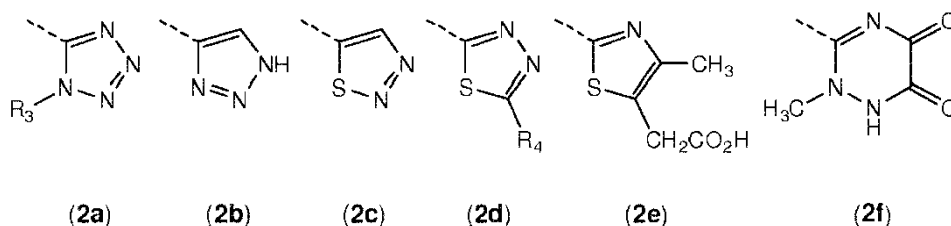
20 Se añadió ácido 7-amino-3-(1,2,3-triazol-4-iltiometil)-3-cefem-4-carboxílico (7-TACA, 1,03 g, 3,29 mmoles) a agua destilada (50 g) y se enfrió hasta 3 °C. La mezcla se agitó a 400 rpm y el pH se llevó a 8,0 con NaOH acuoso (5 M). Se añadió penicilina G acilasa mutante 1 inmovilizada (5 g, véase Materiales y métodos) y a la mezcla resultante se añadió gota a gota una disolución de éster metílico de D-4-hidroxifenilglicina (HPGM) a velocidad de 7 ml/h por una bomba de jeringa (tiempo de dosificación 2 h). Esta disolución se preparó disolviendo HPGM (0,68 g, 3,77 mmoles) en agua (5 g) y H₂SO₄ 25 % (0,5 g en agua). Se siguió la reacción enzimática por HPLC analítica durante 24 h (véase Materiales y métodos; los compuestos se identificaron por comparación de los tiempos de retención de HPLC con patrones comercialmente disponibles). Al final de la adición de HPGM, la mezcla contuvo 0,46 % (p/p) de D-4-hidroxifenilglicina (HPG), 0,02 % (p/p) de HPGM, 1,29 % (p/p) de 7-TACA y 0,77 % (p/p) de cefatrizina (la cantidad de cefatrizina se calculó usando un factor de respuesta estimado del balance de masas). Después de agitar la reacción durante la noche, se hidrolizó el producto y la mezcla contuvo 0,91 % (p/p) de D-4-hidroxifenilglicina (HPG), 0,01 % (p/p) de HPGM y 1,93 % (p/p) de 7-TACA.

REIVINDICACIONES

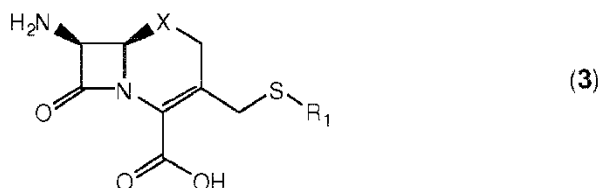
1. Un proceso para la preparación de un compuesto de la fórmula general (1)



5 en la que R₁ es un radical de la fórmula (2a), (2b), (2c), (2d), (2e) o (2f), siendo R₃ CH₃, CH₂CO₂H, CH₂SO₃H, CH₂CH₂OH o CH₂CH₂N(CH₃)₂ y siendo R₄ hidrógeno o CH₃



y en la que R₂ es H u OH y X es CH₂, O o S, caracterizado porque se mezcla un compuesto de la fórmula general (3) o una sal del mismo en la que R₁ y X son como se han definido anteriormente



10 con amida de D-4-hidroxifenilglicina o un éster de D-4-hidroxifenilglicina o amida de D-fenilglicina o un éster de D-fenilglicina en presencia de una penicilina G acilasa a una temperatura de desde -5 °C hasta 20 °C y un intervalo de pH de 8,4 a 9,1.

2. Proceso según la reivindicación 1, en el que dicha penicilina G acilasa está inmovilizada.

15 3. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha penicilina G acilasa es penicilina G acilasa AA o penicilina G acilasa mutante 1.

4. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se lleva a cabo entre 0 °C y 5 °C.

5. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el pH se mantiene por medio de la adición de una disolución acuosa de hidróxido de litio, hidróxido potásico, hidróxido sódico o sus mezclas.

20 6. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho producto de la fórmula general (1) se aísla por medio de cristalización y filtración o centrifugación.

7. Proceso según la reivindicación 6, en el que dicho aislamiento va precedido de retirada de 50-90 % de líquido por medio de filtración y adición de un disolvente orgánico.

8. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que R₁ es un radical de la fórmula (2a) siendo R₃ CH₃ o un radical de la fórmula (2b) y en el que dicha mezcla es con éster etílico de D-4-hidroxifenilglicina o con éster metílico de D-4-hidroxifenilglicina.

25 9. Proceso según la reivindicación 8, en el que R₁ es un radical de la fórmula (2a) siendo R₃ CH₃, que comprende además hacer reaccionar dicho compuesto de la fórmula (1) con un derivado de ácido 4-etil-2,3-dioxo-1-piperazincarboxílico o un derivado de ácido 4-hidroxi-6-metil-nicotínico para dar cefoperazona o cefpiramida, respectivamente.

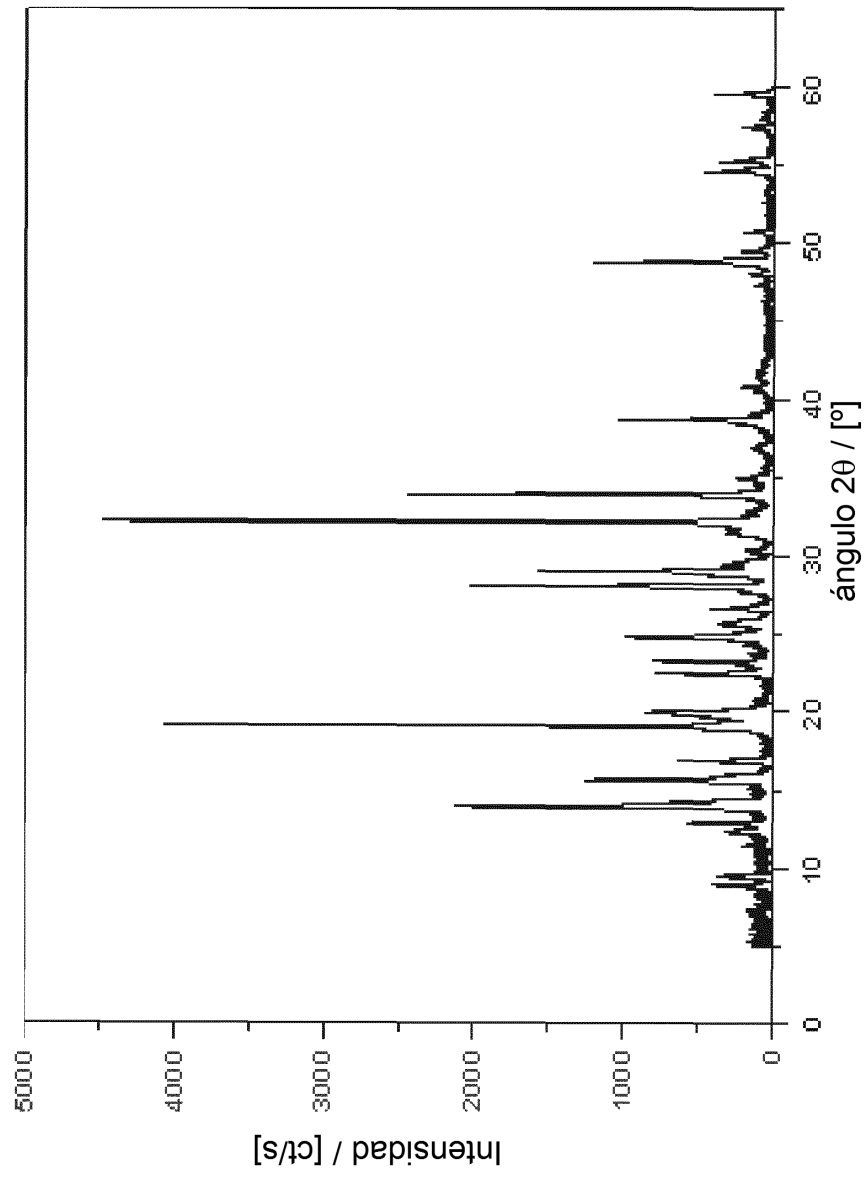


Figura 1

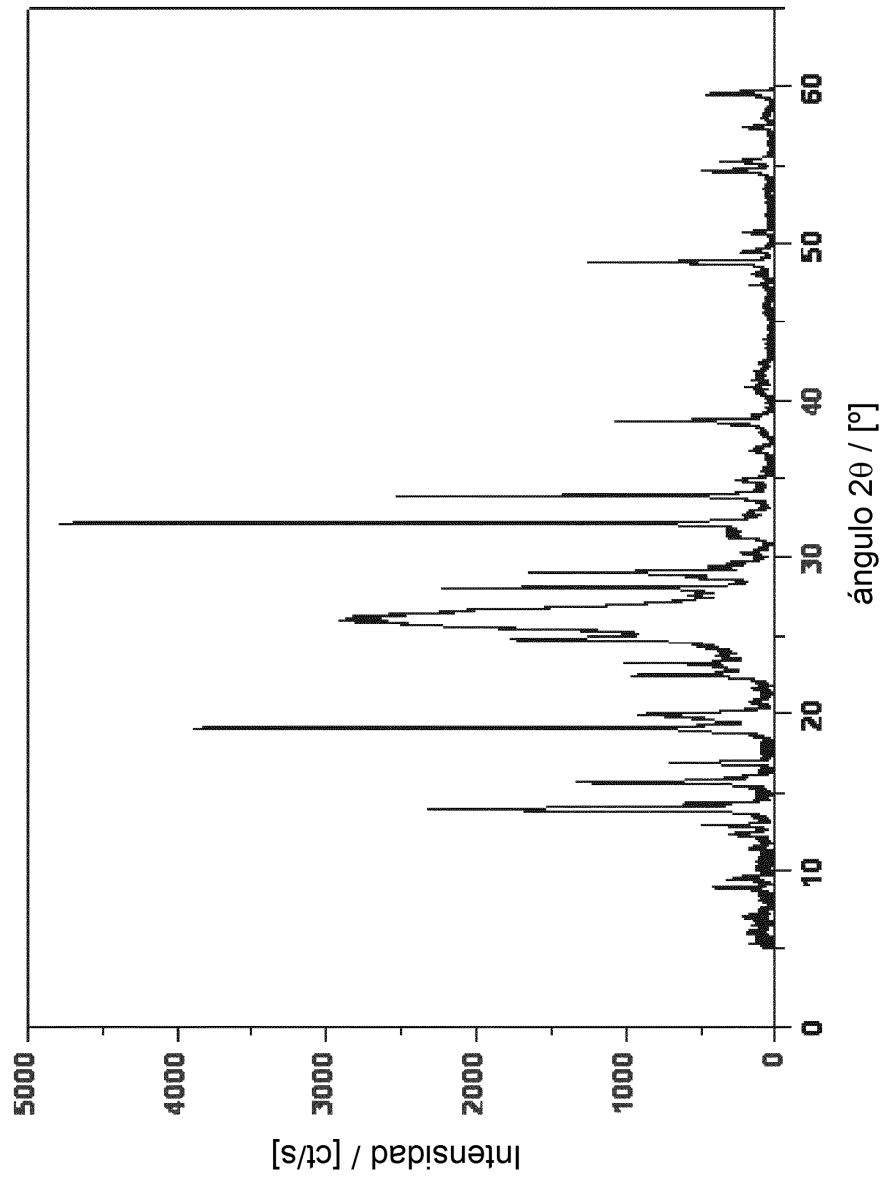


Figura 2