



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: **AT 404 834 B**

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1112/97

(51) Int.Cl.⁶ : **C07D 501/12**
C07D 501/18

(22) Anmeldetag: 30. 6.1997

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 7.1998

(45) Ausgabetag: 25. 3.1999

(56) Entgegenhaltungen:

WO 9707121A1 (BIOCHEMIE GMBH)
JP 90178288A2 (SHISEIDO CO. LTD.)

(73) Patentinhaber:

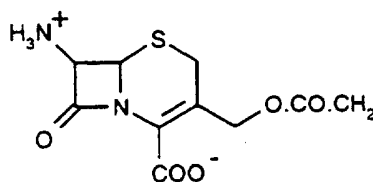
BIOCHEMIE GESELLSCHAFT M.B.H.
A-6250 KUNDL, TIROL (AT).

(54) VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG DER 7-AMINOCEPHALOSPORANSÄURE (7-ACA)

(57) Die Erfindung betrifft eine Verbesserung hinsichtlich der Isolierung von 7-Aminocephalosporansäure durch Zusatz organischer Ester oder polymerer Verbindungen bei der Fällung aus Lösungen.

AT 404 834 B

Die Erfindung betrifft Verbesserungen hinsichtlich der Isolierung der 7-Aminocephalosporansäure (7-ACA)



aus deren schwach sauren, neutralen bzw. alkalischen Lösungen.

7-ACA ist eine Schlüsselzwischenverbindung für die Synthese von vielen semisynthetischen Cephalosporinantibiotika. Sie wird aus Cephalosporin C durch eine chemische oder enzymatische Spaltung der Amidfunktion in der 7-Position des Cephems hergestellt.

Es werden mehrere kommerziell nutzbare chemische N-Deacylierungen beschrieben, z. B. durch Nitrosylchlorid (R.B. Morin et al, J. Am. Chem. Soc., 84, 3400 (1962)), oder durch die Phosphorpentachloridtechnologie, bei der Cephalosporin C oder ein Derivat davon zunächst in das entsprechende Imidchlorid überführt wird. Das Imidchlorid wird dann durch Einwirkung eines Alkohols und Wasser zur 7-ACA hydrolysiert (Chauvette et al, J. Org. Chem., 36, 1259 (1971)), und das Produkt wird in der Spaltlösung als Hydrochlorid der Verbindung der Formel I erhalten. Die Isolierung der Verbindung der Formel I geschieht durch pH-Stellung in den Bereich des isoelektrischen Punktes durch Zugabe einer Base, z.B. von Ammoniak (CS-PS 247 298, US-PS 3 507 862) oder von Natriumhydrogencarbonat (JP-PS 48068595), wobei das Produkt als Betain der Formel I auskristallisiert.

Die enzymatischen Spaltungen von Cephalosporin C können entweder ein- oder zweistufig durchgeführt werden. Die einstufige Spaltung kann durch Verwendung einer Cephalosporin C aktiven Acylase (z.B. aus *Pseudomonas* Kultur, siehe EP 275 901) erreicht werden. Die zweistufige Methode basiert auf der Überführung in Glutaryl-7-aminocephalosporansäure durch D-Aminosäureoxidase, die aus verschiedenen Mikroorganismen (*Trogonopsis variabilis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Pseudomonas*, *Cephalosporium*) gewonnen werden kann (BE 736 934, DT 2 219 454, FR 2 133 927, JP 125696, JP 128295). In der zweiten Stufe folgt eine enzymatische Hydrolyse der Glutaryl-7-aminocephalosporansäure zur 7-ACA. Geeignete Acylasen wurden aus *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* oder *Rhodotorula* Kulturen erhalten (JP 142761, JP 43657, EP 496 993).

Da die enzymatischen Spaltungen von Cephalosporin C in Form eines Alkalimetall- bzw. Ammoniumsalzes im schwach basischen Milieu stattfinden, erfolgt die Isolierung durch pH-Stellung in den Bereich des isoelektrischen Punktes der 7-ACA durch Zugabe einer Säure, z. B. von HCl, wobei das Produkt wiederum als Betain der Formel I auskristallisiert. Vor der Fällung kann die Lösung gegebenenfalls durch Behandlung mit einem geeigneten Ionentauscher (z.B. PA 408, IRA 458, Sephadex A-25) oder Adsorberharz (Diaion HP 20) gereinigt werden.

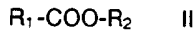
Die durch Ansäuern gefällte 7-ACA kennzeichnet sich durch sehr kleine, lose, nadelförmige Kristalle, die sich nur schwer filtrieren bzw. zentrifugieren lassen. Erschwerend ist, daß mit der steigenden Reinheit der 7-ACA noch feinere Kristalle erhalten werden. Wird z.B. die 7-ACA Lösung vor der Kristallisation zusätzlich über ein Adsorberharz bzw. einen Ionentauscher gereinigt, wird die erhaltene Suspension noch schwerer filtrierbar bzw. zentrifugierbar.

Zudem ist für eine optimale Ausbeute im Fäll/Kristallisationschritt ein Zusatz eines organischen Antilösungsmittel zur Lösung/Suspension der 7-ACA notwendig, um die Löslichkeit der Verbindung der Formel I zu senken. Günstigerweise gibt man einen niedrigeren Alkohol (z.B. Methanol) oder ein Keton (z.B. Aceton) zu. Dabei werden aber die Kristalle wiederum erheblich feiner als aus rein wäßrigen Lösungen und damit schwer isolierbar.

Es wurde nun eine Methode gefunden, die die Bildung von Agglomeraten bzw. Rosetten der 7-Aminocephalosporansäure bei der Fällung aus dem alkalischen, neutralen oder schwach sauren Bereich ermöglicht und dadurch die Filtrations- und Zentrifugationseigenschaften des Produktes erheblich verbessert. Darüber hinaus läßt sich das nach dieser Methode erhaltene Produkt schneller trocknen, was Vorteile im Hinblick auf das Nebenproduktprofil und die Farbe des Cephalosporinzwischenprodukts bringt. Die Verbesserungen in der Isolierbarkeit lassen den Kristallisationsprozess aus dem alkalischen/neutralen bzw. schwach sauren Bereich in den Produktionsmaßstab übertragen.

Das Verfahren basiert auf der Zugabe von bestimmten Zusätzen zu der zu kristallisierenden neutralen, schwach sauren bzw. alkalischen 7-ACA-Lösung. Die erfindungsgemäßen Zusätze können in folgende Gruppen geteilt werden:

a) organische Ester der allgemeinen Formel



worin R_1 und R_2 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, einen niederen Alkylrest, Phenyl, Hydroxyphenyl oder einen niederen Alkylphenylrest darstellen;

b) polymere Glykolverbindungen, vorzugsweise Polyethylen- und Polypropylenglykolderivate, der allgemeinen Formel

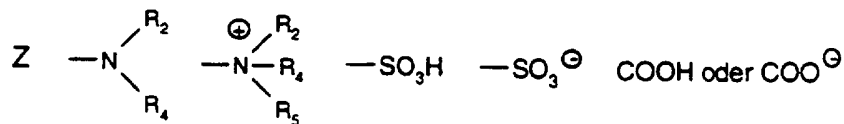


worin R_1 und R_2 die oben angegebene Bedeutung haben und k eine ganze Zahl von 2 bis 200 ist;

c) Polyacryl-Derivate mit kationischem, anionischem oder nichtionischem Charakter der allgemeinen Formel



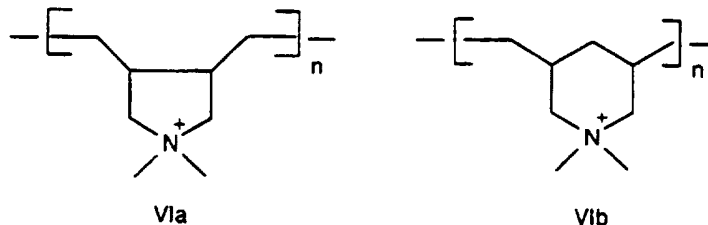
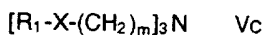
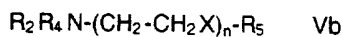
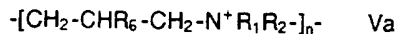
worin X für $-O-$ oder $-NR_1-$ und R_3 für R_1 oder $-(CR_2R_4)_m-Z$ stehen, wobei



bedeutet,

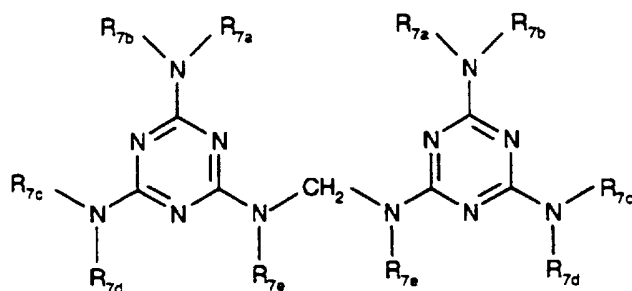
m eine ganze Zahl von 0 bis 6 ist, n eine ganze Zahl von 2 bis 200.000 ist und R_1 , R_2 , R_4 und R_5 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, einen niederen Alkylrest, Phenyl, Hydroxyphenyl oder einen niederen Alkylphenylrest darstellen;

d) (Poly)amine der allgemeinen Formeln



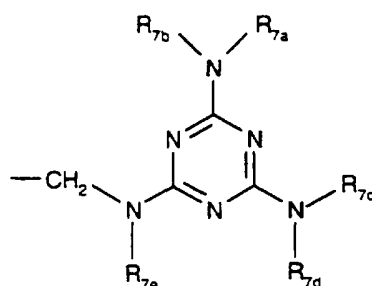
wobei m , n , R_1 , R_2 , R_4 und R_5 die oben angegebene Bedeutung haben und R_6 Wasserstoff oder OH darstellt;

e) Derivate auf der Basis von Melamin-Formaldehyd-Harzen der allgemeinen Formel



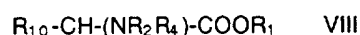
VII

worin R_{7a} , R_{7b} , R_{7c} , R_{7d} und R_{7e} gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, CH_2OH oder eine Gruppe der Formel



darstellen;

f) Aminosäuren und deren Ester der allgemeinen Formel



worin R_{10} für $-(\text{CH}_2)_m-\text{X}-\text{R}_5$ steht und die übrigen Substituenten obige Bedeutung besitzen.

Natürlich sind auch Kombinationen der oben erwähnten Zusätze in beliebiger Wahl und Anzahl zur Förderung der Agglomeration bzw. Rosettenbildung der 7-ACA geeignet.

Die Zugabe jeder der oben genannten Verbindungen bewirkt überraschenderweise die Bildung von Agglomeraten bzw. Rosetten der 7-ACA bei den Fällungen aus dem Gemisch Alkohol/Wasser bzw. Keton/Wasser. Ausgezeichnete Ergebnisse werden auch bei den Fällungen der hochreinen 7-ACA Lösungen nach einer Adsorberharzreinigung (mit z.B. Amberlite XAD 1600, XE-714, Dianion HP21, Sepabeads SP825, SP850) bzw. über einen Ionentauscher (z.B. IRA 420) oder reversed phase z.B. RP-18 gegebenenfalls unter Einbeziehung einer kontinuierlichen Chromatographieanlage wie beispielsweise dem ISEP/CSEP Systems der Firma Advanced Separation Technologies Inc. bzw. simulating moving bed Technologien erhalten.

Die Mengen an den verwendeten erfindungsgemäßen Zusätzen betragen üblicherweise bei den organischen Esterderivaten ca. 1 bis 10 %, bei den polymeren Zusätzen ca. 1 bis 100 ppm bezogen auf die Menge der Fälllösung. Die erfindungsgemäßen Agglomeratförderer von 7-ACA können vor oder gleichzeitig mit der Säure der Lösung bzw. entstehenden Kristallsuspension zugesetzt werden.

Die Konzentration der zu kristallisierenden 7-ACA in Lösung kann in einem breiten Bereich liegen und beträgt vorzugsweise 5 bis 50 g/l.

Die Fällungen können batchweise oder kontinuierlich in einem breiten Temperaturbereich von -15 bis 40 °C durchgeführt werden, ein Optimum liegt zwischen 0 und 25 °C. Bei niedrigen Temperaturen sinkt der Reinigungseffekt der Kristallisation, bei höheren Temperaturen ist das Produkt zunehmend instabil.

Geeignete Säuren zur Fällung sind anorganische Säuren, z.B. Schwefelsäure, Salzsäure oder Phosphorsäure, oder organische Säuren beispielsweise Essigsäure.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern:

Beispiele

Beispiele 1 bis 14:

- 5 In einem Fällreaktor werden 142 ml Wasser und 2.2 g 7-ACA als Impfer vorgelegt, und der pH-Wert wird mit 1 N NaOH-Lösung auf 5.5 korrigiert. Die zu fällende 7-ACA Lösung (Na-Salz bei pH 7.0), bestehend aus 25 g 7-ACA, 708 ml Wasser und gegebenenfalls Methanol (siehe Tabelle 1), wird mit einem geeigneten Zusatz versetzt (siehe Tabelle 1) und innerhalb von 25 Minuten bei 18° zu der Vorlage unter Rührung eingetropft. Während der gesamten Zugabe wird der pH Wert durch Zudosieren von 20 %iger
- 10 Schwefelsäure bei 5.5 gehalten und anschließend auf 4.0 korrigiert. Die Suspension wird auf 0° abgekühlt und 1 Stunde nachgerührt. Die Kristalle werden abfiltriert, mit 120 ml Wasser, 120 ml 70 % Methanol und 120 ml Methanol gewaschen. Das Produkt wird bei 50° unter Vacuum (10 mbar) 16 Stunden getrocknet. Die Filtrationszeiten sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

15

Tabelle 1

Beispiel	Methanol Konz. [ml]	Zusatz	Filtr. Zeit [min]
1	212	Vergleich ohne Zusatz	15
2	212	6.5 ml 1 % Lsng von P3-Ferrocryl 7262	2
3	0	6.5 ml 1 % Lsng von P3-Ferrocryl 7262	1.6
4	0	49.5 ml AcOEt	2.1
5	0	10.6 ml AcOBu	1.1
6	212	13.8 ml AcOBu	2.4
7	212	64.4 ml AcOEt	2.9
8	177	0.8 ml 1 % Lsng von Cysep 2411 (Cytec)	0.8
9	177	0.8 ml 1 % Lsng von C 592 (Cytec)	0.3
10	177	0.8 ml 1 % Lsng von C 567 (Cytec)	0.4
11	177	3.2 ml 1 % Lsng von PEG 300 (Fluka)	2.1
12	177	2.4 ml 1 % Lsng von Triethylentetramin	3.2
13	177	0.8 ml 1 % Lsng von Tris-(2-aminoethyl)amin	3.2
14	177	0.8 ml 1 % Lsng von l-lysin	3.3

40

Beispiele 15 bis 18:

- 45 In einem Fällreaktor wird die zu fällende 7-ACA Lösung (Na-Salz bei pH 7.5), bestehend aus 20.8 g 7-ACA, 500 ml Wasser und gegebenenfalls Methanol (siehe Tabelle 2), bei der Raumtemperatur vorgelegt und mit einem geeigneten Zusatz versetzt (siehe Tabelle 2). Unter Rühren wird der pH Wert durch Zudosieren von 20 %iger Schwefelsäure auf 5.5 gestellt, 20 min gehalten bei diesem Wert konstant gehalten und anschließend auf 3.8 korrigiert. Die Suspension wird auf 0° abgekühlt und 1 Stunde nachgerührt. Die Kristalle werden abfiltriert, mit 100 ml Wasser, 100 ml 70 % Methanol und 100 ml
- 50 Methanol gewaschen. Das Produkt wird bei 50° unter Vacuum (10 mbar) 16 Stunden getrocknet. Die Filtrationszeiten sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

55

Tabelle 2

Beispiel	Methanol [ml]	Zusatz	Filtr. Zeit [min]
15	150	Vergleich ohne Zusatz	14
16	100	9 ml 1 AcBu	1.5
17	150	6.5 ml 1 % Lsng von Ferrocryl 7262 (Henkel)	1.4
18	150	3.2 ml 1 % Lsng von Rohafloc KF760 (Rhöm)	3.0

Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung der 7-Aminocephalosporansäure (7-ACA) aus deren schwach sauren, neutralen oder alkalischen Lösungen durch Fällung, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
- a) organische Ester der allgemeinen Formel



worin R_1 und R_2 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, einen niederen Alkylrest, Phenyl, Hydroxyphenyl oder einen niederen Alkylphenylrest darstellen;

b) polymere Glykolverbindungen, vorzugsweise Polyethylen- und Polypropylenglykolderivate, der allgemeinen Formel



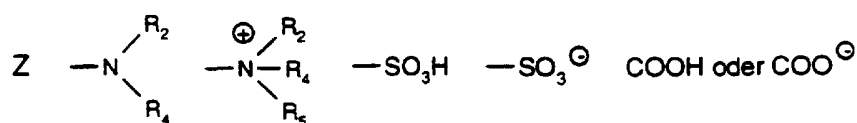
worin R_1 und R_2 die oben angegebene Bedeutung haben und k eine ganze Zahl von 2 bis 200 ist;

c) Polyacryl-Derivate mit kationischem, anionischem oder nichtionischem Charakter der allgemeinen Formel



worin X für $-O-$ oder $-NR_1-$ und R_3 für R_1 oder $-(CR_2R_4)_m-Z$ stehen,

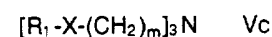
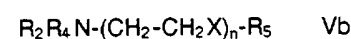
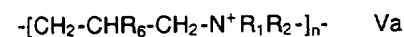
wobei

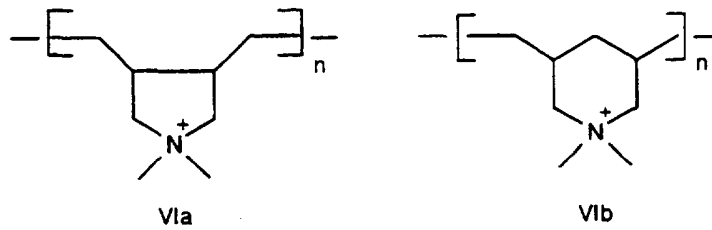


bedeutet,

m eine ganze Zahl von 0 bis 6 ist, n eine ganze Zahl von 2 bis 200.000 ist und R_1 , R_2 , R_4 und R_5 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, einen niederen Alkylrest, Phenyl, Hydroxyphenyl oder einen niederen Alkylphenylrest darstellen;

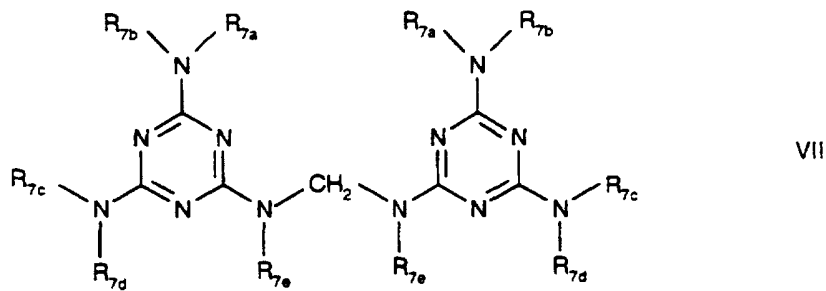
d) (Poly)amine der allgemeinen Formeln



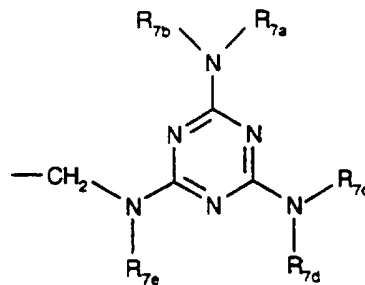


wobei m, n, R₁, R₂, R₄ und R₅ die oben angegebene Bedeutung haben und R₆ Wasserstoff oder OH darstellt;

e) Derivate auf der Basis von Melamin-Formaldehyd-Harzen der allgemeinen Formel

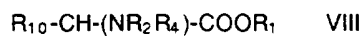


worin R_{7a}, R_{7b}, R_{7c}, R_{7d} und R_{7e} gleich oder verschieden sind und Wasserstoff, CH₂OH oder eine Gruppe der Formel



darstellen;

f) Aminosäuren und deren Ester der allgemeinen Formel



worin R₁₀ für -(CH₂)_m-X-R₅ steht und die übrigen Substituenten obige Bedeutung besitzen, bei der Fällung zusetzt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man 1 bis 10 % einer Verbindung der Formel II zusetzt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man 1 bis 100 ppm einer Verbindung der Formel III, IV, Va, Vb, Vc, VIa, VIb oder VII zusetzt.