



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 302 342**

(51) Int. Cl.:

C12P 37/00 (2006.01)

C12P 37/02 (2006.01)

C12P 35/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12P 35/04 (2006.01)

C12P 37/04 (2006.01)

C07C 219/22 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **97934136 .9**

(86) Fecha de presentación : **15.07.1997**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0920527**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.1999**

(54)

Título: **Síntesis de β -lactamas antibacterianas usando ésteres de cadena lateral solubles y una enzima acilasa.**

(30)

Prioridad: **26.07.1996 US 22622 P**

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2008

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2008

(73)

Titular/es: **Bristol-Myers Squibb Company**
P.O. Box 4000
Princeton, New York 08543-4000, US

(72)

Inventor/es: **Usher, John, J. y**
Romancik, Guna

(74)

Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 302 342 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).

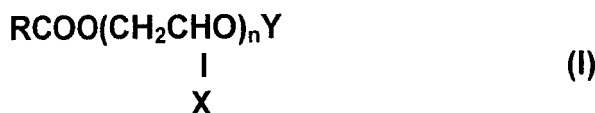
DESCRIPCIÓN

Síntesis de β -lactamas antibacterianas usando ésteres de cadena lateral solubles y una enzima acilasa.

La presente invención está dirigida a un procedimiento para la producción de β -lactamas antibacterianas, específicamente penicilinas y cefalosporinas, en presencia de la enzima, penicilina G amidasa, y de un éster soluble como fuente de acilo. La invención está dirigida, también, a nuevos ésteres útiles como reactivos en dicho procedimiento.

Descripción de la técnica relacionada

Las publicaciones de patentes japonesas n° 47-25388, 47-29588, 48-26985, 48-35090, 48-99393, 49-14687, 49-36890, 49-48892, 49-75787, 49-134893 y 52-110896 describen procedimientos para la preparación de penicilinas o cefalosporinas haciendo reaccionar un éster metílico o etílico del resto acilo que se va a introducir, con el ácido 6-aminopenicilánico o con el ácido 7-aminocefalosporánico o con derivados de los mismos. La fuente de acilo en estas referencias es un éster de alquilo inferior y, especialmente, un éster metílico. Eji Kondo, *et al.*, Patente de EE.UU n° 4.340.672, expedida el 20 de Julio de 1982, revela un procedimiento para la preparación de β -lactamas antibacterianas, esto es, penicilinas y cefalosporinas, por la acción de un acilasa sobre el núcleo amina de una penicilina o cefalosporina y un éster (I) de la fórmula siguiente, como fuente de acilo



en la que RCO es un grupo acilo de las cadenas laterales de la penicilina o cefalosporina; X es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo inferior o un grupo hidroxialquilo inferior; Y es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior; y n es un número entero de 1 a 20. El procedimiento anterior utiliza el éster de (poli)etilenglicol como fuente de acilo, que se mezcla libremente con agua, en comparación con otras fuentes de acilo conocidas tales como los ésteres de metilo, que tienen baja solubilidad.

Maladkar N.K., *Enzyme and Microbial Technology*, Aug. 1994, 16 (8), 715-718, revela la producción enzimática de cefalexina, utilizando una penicilina G acilasa inmovilizada, a partir del ácido 7-amino-3-deacetoxicefalosporánico (7-ADCA) y del éster metílico de fenilglicina. Robak M. *et al.*, *Acta Biochimica Polonica*, 1981, 28 (3-4), 275-284, revela la producción enzimática de ampicilina, utilizando una penicilina amidasa inmovilizada, a partir del ácido 6-aminopenicilámico (6-APA) y del éster metílico de fenilglicina. Fernandez-Lafuente R. *et al.*, *Enzyme and Microbial Technology*, 1 de Julio de 1996, Vol. 9-14, revela la síntesis de cefaloglicina, catalizada por derivados de la penicilina G acilasa estabilizada e inmovilizada, a partir del ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) y del éster metílico de fenilglicina.

El documento WO 92/01061, transferido a Novo Nordisk y publicado el 23 de enero de 1992, se refiere a un procedimiento para la preparación de derivados de la β -lactama por acilación enzimática del amino parental de la β -lactama con amidas como agentes de acilación.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un nuevo procedimiento para la preparación de β -lactamas antibacterianas, esto es penicilinas y cefalosporinas, por la acción de la penicilina G amidasa recombinante inmovilizada, sobre un núcleo amina de la penicilina o de la cefalosporina y un éster que tiene la fórmula (II) como fuente de acilo



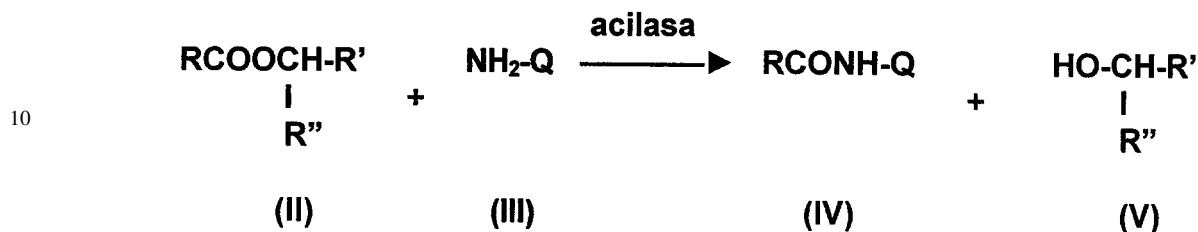
en la que RCO es un grupo acilo de la cadena lateral de la penicilina o de la cefalosporina; R' es CH_2X o CHXY ; R'' es H o CH_2Y o CHXY y X es hidroxialquilo inferior e Y es hidrógeno, alquilo inferior o hidroxialquilo inferior.

Descripción detallada de la invención

Como se utiliza en esta memoria descriptiva, a menos que se indique de otra forma explícitamente o por el contexto, el grupo acilo representado por RCO es un acilo de penicilinas o cefalosporinas naturales o sintéticas. El alquilo inferior incluye alquilos de 1 a 4 átomos de carbono.

Un aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de β -lactamas antibacterianas al hacer reaccionar un éster de fórmula (II) con una aminoacetidinona de un ácido carboxílico de fórmula (III) en presencia de una penicilina G amidasa recombinante inmovilizada, en un medio acuoso para producir la β -lactama antibacteriana de fórmula (IV)

5



10

en la que RCO es un grupo acilo y NH₂-Q es una fuente de amino

15

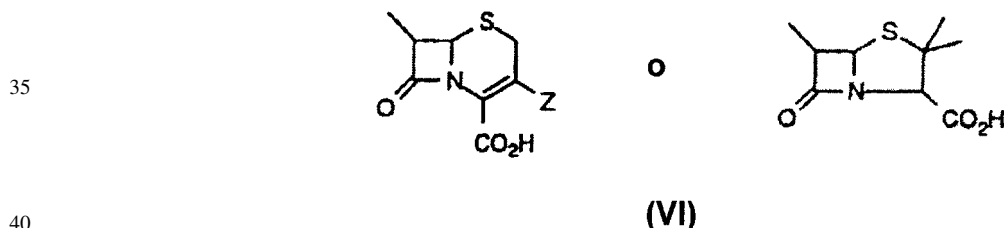
Los sustituyentes R' y R'' se definen como anteriormente. El grupo acilo RCO puede ser un alcanilo inferior o un alquenoilo inferior lineal, ramificado, cíclico o parcialmente cíclico; un aralcanilo inferior monocíclico; un ariloxi alcanilo inferior monocíclico; un alcanilo inferior (O, N o S)-heterocíclico; un tio-alcanilo inferior (O, N o S)-heterocíclico; un cianoacetilo; un cianometil-tioacetilo; un arilglicilo monocíclico; un cicloalquenilglicilo monocíclico; un arilglicolilo monocíclico; un N-acil-arilglicilo, un arilmalonilo o un arilsulfoalcanilo monocíclico, pudiendo tener todos ellos, de manera opcional, un sustituyente alquilo inferior, aminometilo, halógeno, hidroxilo, alcaniloxi inferior o alcoxi inferior, y conteniendo, preferentemente de 1 a 15 átomos de carbono.

20

Los grupos RCO preferidos son el D-fenilglicilo y el 4-hidroxio-D-fenilglicilo, que son muy conocidos como cadenas laterales de antibióticos tales como la cefalexina y la amoxicilina.

La fuente de amino NH₂-Q se refiere al sustituyente en el grupo amino en 7 o sobre el grupo amino en 6 de los antibióticos penicilina o cefalosporina conocidos, en que Q tiene la fórmula (VI).

25



30

35

en la que Z es hidrógeno, halógeno, alquilo inferior de 1-3 átomos de carbono, haloalquilo de 1-3 átomos de carbono o alquenoilo C₂₋₄.

40

El átomo de halógeno es cloro, bromo o yodo.

45

La penicilina G amidasa se puede obtener de bacterias *Escherichia coli* por procedimientos que son muy conocidos en la técnica. También, se puede obtener utilizando bacterias *E. coli* recombinantes, que contienen el gen de la penicilina G amidasa con un promotor tac, mediante procedimientos que son muy conocidos en la técnica. Se prefiere este procedimiento debido a que hace posible que estén disponibles grandes cantidades de la enzima adecuada para el procedimiento de fabricación.

50

Las aminoacetidinonas de los ácidos carboxílicos de fórmula (III) se pueden usar como sales de metales alcalinos solubles en agua, tal como las de sodio, litio y potasio, o como un éster, tal como el éster metanosulfoniletilo o el éster acetonoilo. Las aminoacetidinonas de fórmula (III) y sus sales o ésteres son compuestos conocidos y se pueden preparar por procedimientos conocidos.

55

Los ésteres de fórmula (II) se pueden preparar por procedimientos conocidos, esto es, mediante la reacción de un ácido RCOOH con un diol, triol o poliol de fórmula (V)

60

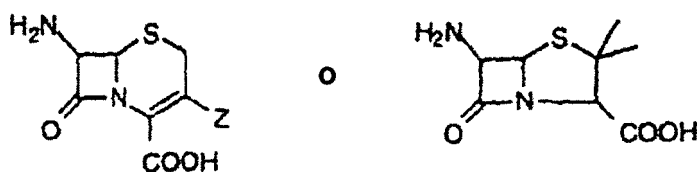


65

en la que RCO, R' y R' se definen como anteriormente. La reacción de esterificación puede ser por deshidratación bajo condiciones catalizadas por un ácido o por la adición de un haluro o mediante reacciones de intercambio de ésteres. El RCOOH y el diol, triol o poliol son compuestos conocidos o se pueden obtener mediante procedimientos que son muy conocidos en la técnica.

Otro aspecto de la invención proporciona el éster R-COO-CH₂-CH₂-OH en el que R es un D-fenilglicilo o un 4-hidroxi-D-fenilglicilo. Estos ésteres son reactivos nuevos e importantes en el procedimiento de la invención debido a que proporcionan rendimientos superiores al 90% de los productos finales. Estos ésteres se preparan por procedimientos conocidos.

Una forma de realización preferida de la presente invención es un procedimiento para la preparación de β -lactamas antibacterianas, esto es, cefprozil, cefadroxil y amoxicilina por la acción de la penicilina G amidasa sobre las aminas de penicilina o de cefalosporina de fórmula siguiente (VII)



6-APA

(VII)

en la que Z es un grupo metilo (en 7-ADCA) o 1-propenilo (en 7-PACA, el núcleo de cefprozil) y un éster de fórmula (VIII)



(VIII)

en la que R es 4-hidroxi-D-fenilglicilo. Las aminas de penicilina o de cefalosporina de fórmula (VII) son compuestos conocidos y se pueden obtener por procedimientos muy conocidos en la técnica. El éster de fórmula (VIII) se puede obtener haciendo reaccionar RCOOH, en la que R se define como anteriormente, con etilenglicol. El compuesto RCOOH y el etilenglicol están disponibles comercialmente.

El procedimiento de la invención se lleva a cabo preparando una disolución que contiene el éster, la amina de cefalosporina o de penicilina y la enzima, sin un tampón, a temperatura ambiente. Esta disolución se prepara disolviendo el éster en agua y añadiendo hidróxido amónico hasta que se alcanza un pH de 7,5. Posteriormente, se añade la amina de penicilina o de cefalosporina a la disolución del éster y se ajusta de nuevo el pH a 7,5 con hidróxido amónico. Posteriormente, la mezcla se enfría hasta 5-15°C y se le añade la enzima sólida. Durante este tiempo, el pH disminuye aproximadamente 0,6 unidades y no se mantiene a 7,5. La mezcla de reacción se analiza, posteriormente, mediante cromatografía líquida de alta presión, por ejemplo sobre una columna de fase reversa C18, de 5 cm x 4,6 mm, 5 μ m spherisorb ODS2. El producto final se obtiene con un rendimiento del 90-99%.

El procedimiento de esta invención genera la β -lactama antibacteriana final con un rendimiento habitual superior al 90%, algunas veces superior al 95% y, ocasionalmente, superior al 99%. El rendimiento obtenido por los ésteres de alquilo sencillos, tales como metilo, están generalmente en el intervalo del 70 al 90%. Debido al alto rendimiento del antibiótico final obtenido por el presente procedimiento, éste es muy útil para la fabricación de los antibióticos penicilina o cefalosporina.

Una mezcla de reacción típica contiene del 5-35% de la fuente de acilo (VIII) (preferentemente del 8-12%) y del 2-20% de la fuente de amina (VII) (preferentemente del 2-5%). En la forma de realización preferida anterior, la enzima puede estar presente en una forma soluble o insoluble, pero, preferentemente, la enzima está presente en forma de una preparación insoluble inmovilizada. Esta preparación tiene ventajas, tales como una estabilidad mejorada de la enzima y, también, una facilidad relativa para eliminar la enzima inmovilizada de las mezclas de reacción, como una primera etapa en el proceso de aislamiento del antibiótico.

ES 2 302 342 T3

La invención se ilustra, pero no se limita de ninguna forma, por los Ejemplos siguientes:

Ejemplo 1

- 5 *Síntesis de cefprozil a partir de (VII) utilizando como enzima una penicilina G amidasa recombinante inmovilizada y como fuente de acilo un éster hidroxietilo de 4-hidroxi-D-fenilglicina, preparado por una reacción catalizada por un ácido*

Una mezcla de 4-hidroxi-D-fenilglicina (10 g), etilenglicol (15 ml) y ácido sulfúrico concentrado (5 ml) se agitó
10 durante 18 horas a 55°C bajo condiciones anhidras. La disolución se enfrió y, posteriormente, se le añadió hielo (10 g) y se ajustó el pH a 1,0 con 10 N NH₄OH (4,5 ml) para generar 40 ml de disolución del éster hidroxietilo.

La mezcla de la enzima de 20 ml, que contenía un 10% del éster, un 4% de (VII) y un 8% de la enzima (equivalente a 32 IU/ml de enzima), se realizó sin tampones como sigue:

15 La disolución de éster preparada anteriormente (6,9 ml) se mezcló con agua (2 ml) y se ajustó a pH 7,5 con 10N NH₄OH. Posteriormente, se le añadió el compuesto (VII) (0,8 g) y se ajustaron el pH a 7,5 con 1N NH₄OH y el volumen a 18,4 ml. Posteriormente, la mezcla se enfrió a 5-15°C y se le añadió la enzima sólida (1,6 g; 640 IU). El pH no se mantuvo a 7,5, disminuyendo aproximadamente 0,6 unidades durante
20 la reacción. La mezcla de reacción se analizó por HPLC en una columna de fase reversa C18, de 5 cm x 4,6 mm, 5 µm spherosorb ODS2. La fase móvil fue 10% acetonitrilo/0,3% H₃PO₄, a 2 ml/minuto, con detección a 215 nm. Los isómeros de cefprozil aparecieron en el minuto 2,9 (cis) y en el minuto 5,1 (trans). El producto final se obtuvo con un rendimiento máximo del 92-96%. El experimento total se completó en 25-50 minutos.

Ejemplo 2

- 30 *Síntesis de cefprozil a partir de (VII) utilizando como enzima una penicilina G amidasa recombinante inmovilizada y como fuente de acilo un éster hidroxietilo de 4-hidroxi-D-fenilglicina*

El éster purificado se preparó mediante la reacción de la sal de Dane de 4-hidroxi-D-fenilglicina con bromoetanol y se obtuvo en forma de una sal clorhidrato cristalina.

- 35 La mezcla de reacción de 20 ml, que contenía un 12,5% del éster, un 4% de (VII) y un 8% de la enzima (equivalente a 24 IU/ml de enzima), se preparó como sigue:

El éster purificado (2,5 g), preparado como se describió anteriormente, se mezcló con agua (9 ml) y se ajustó a pH 8,0 con NH₄OH concentrado para dar lugar a una disolución. Se añadió el compuesto (VII) (0,8 g) a la
40 disolución y se ajustó el pH de ésta a 6,76 con 2M H₂SO₄ y el volumen a 18,4 ml. Esta disolución se enfrió a 15°C y, posteriormente, se le añadió la enzima sólida (1,6 g; 480 IU). El pH no se mantuvo y disminuyó aproximadamente 0,6 unidades durante la reacción. El producto final se obtuvo con un rendimiento máximo del 99%. El porcentaje de área de (VII) sin reaccionar descendió al 0,7%. El experimento total se completó en veinticinco minutos.

Ejemplo 3

- 50 *Síntesis de cefprozil a partir de 7-ADCA utilizando como enzima la penicilina G amidasa de Boehringer y como fuente de acilo un éster hidroxietilo de 4-hidroxi-D-fenilglicina, preparado por una reacción catalizada por un ácido*

El éster se preparó como en el Ejemplo 1. El experimento se repitió como en el Ejemplo 1 pero a 15°C y utilizando 1,6 de la enzima de Boehringer. La mezcla de reacción se analizó por HPLC en una columna de Merck 250-4 LiChrosorb RP-18 (10 µm), con 10% acetonitrilo/1% NH₄H₂PO₄ como fase móvil, a un caudal de 1,3 ml/minuto,
55 con detección a 280 nm. El producto final se obtuvo con un rendimiento máximo del 95%. El experimento total se completó en 35 minutos.

Ejemplo 4

- 60 *Síntesis de amoxicilina a partir de 6-APA utilizando como enzima una penicilina G amidasa de Boehringer y como fuente de acilo un éster hidroxietilo de 4-hidroxi-D-fenilglicina, preparado por una reacción catalizada por un ácido*

Una mezcla con un volumen de 20 ml, que contenía un 12% del éster, un 3% de 6-APA y un 8% de la enzima, se
65 preparó como sigue:

Una disolución del éster (preparada como en el Ejemplo 1, 8,3 ml) se mezcló con agua (2 ml) y se ajustó a pH 7,5 con 10N NH₄OH. Posteriormente, se añadió el compuesto 6-APA (0,6 g) a la disolución y se

ES 2 302 342 T3

ajustó el pH a 7,0 con hidróxido amónico 1N hasta un volumen a 18,4 ml. Posteriormente, la disolución se enfrió a 20°C y se le añadió la enzima de Boehringer (1,6 g). Esta disolución se analizó por HPLC en una columna de fase reversa C18, de 5 cm x 4,6 mm, 5 μ m spherosorb ODS2. La fase móvil fue 2,5% acetonitrilo/0,25M NaH₂PO₄ equilibrada a pH 3,5 con H₃PO₄, a un caudal de 1 ml/minuto, con detección a 215 nm. El producto final se obtuvo con un rendimiento del 90-95%, en 160 minutos.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

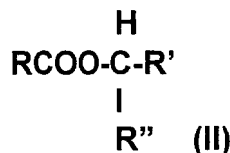
55

60

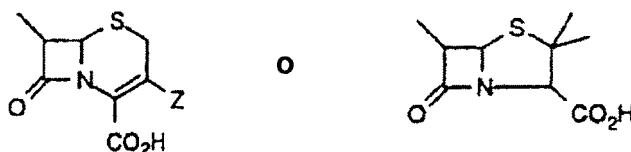
65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de una penicilina o una cefalosporina que comprende el hacer reaccionar una amina de fórmula $\text{NH}_2\text{-Q}$ (III) con un éster de fórmula (II)



en presencia de una penicilina G amidasa recombinante inmovilizada, en la que Q es



en la que Z es hidrógeno, halógeno, alquilo inferior de 1-3 átomos de carbono, haloalquilo de 1-3 átomos de carbono, alqueno C_{2-4} ; RCO es un alcanilo inferior o un alquenoilo inferior lineal, ramificado, cíclico o parcialmente cíclico, un aralcanilo inferior monocíclico, un ariloxi alcanilo inferior monocíclico, un alcanilo inferior (O, N o S)-heterocíclico, un tio-alcanilo inferior (O, N o S)-heterocíclico, un cianoacetilo, un cianometil-tioacetilo, un arilglicilo monocíclico, un cicloalquénilglicilo monocíclico, un arilglicililo monocíclico, un N-acil-arilglicilo, un arilmalonilo o un arilsulfoalcanilo monocíclico, pudiendo tener todos ellos, de manera opcional, un sustituyente alquilo inferior, aminometilo, halógeno, hidroxilo, alcaniloxi inferior o alcoxi inferior, y conteniendo de 1 a 15 átomos de carbono; R' es CH_2X o CHXY ; R'' es hidrógeno, CH_2Y o CHXY , en el que X es hidroxilo e Y es hidrógeno, alquilo inferior o hidroxilo alquilo inferior, para producir una penicilina o cefalosporina de fórmula (IV)

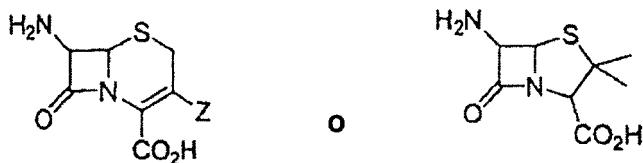


en la que RCO y Q son como se definió anteriormente.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que $\text{NH}_2\text{-Q}$ es una sal de un metal alcalino soluble en agua o un éster.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que R' es CH_2OH , R'' es hidrógeno y R es D-fenilglicilo o 4-hidrox-D-fenilglicilo.

4. Un procedimiento para la producción de un antibiótico cefprozil, cefadroxil o amoxicilina, que comprende hacer reaccionar



en el que Z es un grupo metilo o 1-propenilo, con un éster de fórmula $\text{R-COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$, en el que R es 4-hidrox-D-fenilglicilo, en presencia de una enzima penicilina G amidasa para producir cefprozil, cefadroxil o amoxicilina.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la enzima es una penicilina G amidasa recombinante inmovilizada.

6. Un compuesto de fórmula $\text{R-COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$, en el que R es D-fenilglicilo o 4-hidrox-D-fenilglicilo.