



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0808685-0 A2



(22) Data de Depósito: 10/03/2008
(43) Data da Publicação: 19/08/2014
(RPI 2276)

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

(54) Título: PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE BETA-LACTAMA. **(57) Resumo:**

(30) Prioridade Unionista: 09/03/2007 EP 07103850.9

(73) Titular(es): Dsm Ip Assets B.V.

(72) Inventor(es): Harold Monro Moody, THEODORUS JOHANNES GODFRIED MARIA VAN DOOREN, Thomas Van Der Does

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT EP2008052809 de 10/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/110527 de 18/09/2008

**PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE
BETA-LACTAMA**

A presente invenção se refere a um processo para a preparação de compostos semissintéticos de β -lactama por
5 acilação enzimática do β -lactama amino de origem com o agente de acilação.

A produção enzimática de antibióticos semissintéticos de β -lactama por acilação da fração β -lactama amino de origem com um derivado ácido da cadeia
10 lateral, tal como uma amida ou um éster, vem sendo amplamente descrita na literatura de patente, por exemplo, EP-A-339751, EP-A-473008, WO92/01061, WO93/12250, WO96/02663, WO96/05318, WO96/23796, WO97/04086, WO98/56946, WO99/20786, WO2005/00367, WO2006/069984, US 3.816.253, e
15 Patentes Alemãs 2163792 e 2621618. As enzimas usadas na técnica são em sua maioria penicilina acilases obtidas de *Escherichia coli* e são imobilizadas em vários tipos de materiais insolúveis em água (por exemplo, WO97/04086).

Uma desvantagem principal dos processos da técnica
20 anterior é que os ésteres da cadeia lateral devem ser isolados em uma forma sólida, a fim de purificar o éster da cadeia lateral, por exemplo, reduzir a quantidade da cadeia lateral livre no éster. Foi verificado que, especificamente no caso das cadeias laterais mais hidrófobas, tais como, D-
25 fenilglicina e D-diidro-fenilglicina, a presença da cadeia lateral livre na reação subsequente de acoplamento enzimático o que apresenta um efeito negativo forte no rendimento da reação de acoplamento enzimático. Isto se atribui ao fato de que, em razão da baixa solubilidade das
30 cadeias laterais livres sob condições da reação de

acoplamento enzimático, existe um limite superior para a concentração da cadeia lateral livre na reação de acoplamento enzimático. Este limite é determinado pelo requisito de que a cadeia lateral livre não deve
5 cristalizar ou se precipitar, uma vez que os precipitados afetam negativamente a capacidade de processamento da reação de acoplamento enzimático. Além disso, nas etapas finais do processamento a jusante do composto semissintético de β -lactama, a cadeia lateral livre
10 contaminante precisa ser removida, por exemplo, com o líquido principal de uma etapa de cristalização final do composto semissintético de β -lactama. Em níveis mais altos da cadeia lateral livre, mais licor principal é preciso para remover a cadeia lateral livre que, por sua vez, é
15 responsável por perdas mais altas de composto semissintético de β -lactama. A operação da unidade que resulta no isolamento do éster da cadeia lateral na forma sólida complica o processo de produção do antibiótico semissintético e contribui, significativamente, para o
20 custo do mesmo.

Portanto, existe uma necessidade premente de um processo de produção, no qual o éster da cadeia lateral formado durante a reação de esterificação possa ser usado na reação de acoplamento enzimático subsequente, sem ser
25 isolado em uma forma sólida.

O WO98/04732 revela nos Exemplos 1, 3 e 4 a síntese de cefprozila, cefadroxila e amoxicilina a partir de 7-PACA, 7-ADCA e 6-APA respectivamente, com o éster 2-hidroxietila de D-4-hidróxi-fenilglicina, pelo que o éster
30 após sua síntese é adicionado diretamente à reação de

acoplamento enzimático subsequente sendo isolado em uma forma sólida. A D-4-hidróxi-fenilglicina possui uma solubilidade muito boa nas condições da reação de acoplamento enzimático e, portanto, não causa problemas durante a reação de acoplamento enzimático, como os que são encontrados com a D-fenilglicina e D-diidro-fenilglicina. A fim de evitar sua precipitação, estas podem estar presentes em uma concentração apenas muito baixa, como resultado de sua baixa solubilidade.

É um objetivo da presente invenção prover um processo de produção para os derivados de β -lactama de D-fenilglicina e D-diidro-fenilglicina, tais como Ampicilina, Cefalexina, Cefaclor e Cefradina, onde a síntese do éster da cadeia lateral é caracterizada por um alto rendimento e o éster da cadeia lateral resultante contém apenas, baixas concentrações de cadeias laterais livres e onde é omitido o isolamento do éster da cadeia lateral em uma forma sólida a fim de purificar o éster da cadeia lateral.

"Núcleo" é definido no presente documento como a fração β -lactama do composto semissintético de β -lactama e pode ser qualquer penem ou cefem, por exemplo, ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), ácido 7-aminodeacetóxi-cafalosporânico (7-ADCA), ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) ou 7-amino-3-cloro-3-cefem-4-carboxilato (7-ACCA).

"Cadeia lateral" é definida no presente documento como a fração que no composto β -lactama semissintético é anexada à posição 6-amino ou 7-amino no núcleo, conforme definido no presente documento, por exemplo, D-fenilglicina em Ampicilina, Cefalexina, Cefaclor ou D-diidro-fenilglicina em Cefradina.

"Cadeia lateral livre" é a forma não derivada da cadeia lateral, por exemplo, D-fenilglicina ou D-diidro-fenilglicina.

5 "Éster da cadeia lateral" é a forma éster da cadeia lateral livre, pelo que o grupo carboxila da cadeia lateral livre é esterificado em um álcool, por exemplo, éster D-fenilglicina metílico ou éster D-diidro-fenilglicina metílico. O éster da cadeia lateral pode estar na forma da base livre ou como um sal, por exemplo, como um sal HCL e o
10 éster da cadeia lateral pode estar em uma forma sólida ou dissolvido em um solvente apropriado.

"Taxa" é definida no presente documento como:

$$\frac{[\text{Quantidade de éster da cadeia lateral}]}{[\text{Quantidade de éster da cadeia lateral}] + [\text{Quantidade da cadeia lateral livre}]}$$

15 pelo que as quantidades são expressas em mols.

Em um aspecto, a invenção provê um processo para a síntese de um composto semissintético de β -lactama, a partir de um núcleo e uma cadeia lateral selecionada do grupo consistindo em D-fenilglicina e D-diidro-fenilglicina, na forma de um éster da cadeia lateral e uma
20 enzima catalisando o acoplamento do éster da cadeia lateral em relação ao núcleo, caracterizado pelo fato de que o éster da cadeia lateral não é isolado como um intermediário sólido. O processo pode compreender, por exemplo, as etapas
25 que se seguem:

a) conversão de uma cadeia lateral livre selecionada do grupo consistindo em D-fenilglicina e D-diidro-fenilglicina com um álcool para formar uma mistura compreendendo o éster da cadeia lateral correspondente; a
30 formação do éster da cadeia lateral nesta etapa resulta,

preferivelmente, em uma mistura com uma conversão que é expressa pela "taxa" conforme definida anteriormente no presente documento e pelo que a taxa é preferivelmente $\geq$ 85%, mais preferivelmente $\geq$ 90%, mais preferivelmente $\geq$ 95%, mais preferivelmente $\geq$ 96%, mais preferivelmente $\geq$ 97%, mais preferivelmente $\geq$ 98%, mais preferivelmente $\geq$ 99%;

b) formação do composto semissintético de β -lactama por combinação da mistura obtida na etapa a) com um núcleo e a enzima para formar o composto semissintético de β -lactama, contanto que o éster da cadeia lateral formado na etapa (a) não seja isolado como um intermediário sólido.

O núcleo empregado no processo da presente invenção e conforme definido anteriormente no presente documento, pode ser selecionado do grupo consistindo em ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), ácido 7-amino-desacetóxi-cefaloesporânico (7-ADCA), ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) e 7-amino-3-cloro-3-cefem-4-carboxilato (7-ACCA) de modo a fornecer penicilinas semissintéticas (derivadas de 6-APA) e cefalosporinas semissintéticas (derivadas de 7-ADCA, 7-ACA e 7-ACCA), respectivamente. Uma concretização preferida da presente invenção é o processo para a preparação de um composto semissintético de β -lactama selecionado do grupo consistindo em ampicilina, cefalexina, cefradina, cefaclor.

Na etapa de conversão (etapa (a)) do processo da invenção, uma cadeia lateral livre selecionada do grupo consistindo em D-fenilglicina e D-diidro-fenilglicina é convertida com um álcool para formar uma mistura compreendendo o éster da cadeia lateral correspondente. O álcool empregado no processo da invenção pode ser

selecionado do grupo consistindo em metanol e etanol, deste modo formando o éster metílico e éster etílico da cadeia lateral, respectivamente. O álcool mais preferido é o metanol. A etapa (a) pode ser realizada de vários modos.

5 Uma concretização da etapa de conversão (a) compreende aquecimento de uma mistura compreendendo uma cadeia lateral livre selecionada do grupo consistindo em D-fenilglicina e D-diidro-fenilglicina, um álcool selecionado com base no éster desejado a ser formado, por exemplo,
10 metanol para obter o éster metílico ou etanol para obter o éster etílico, e um ácido forte tal como ácido sulfúrico, sob refluxo a uma temperatura entre 20 e 120°C, mais preferivelmente entre 40 e 100°C. Quando se emprega metanol como o álcool, a temperatura está preferivelmente entre 60
15 e 80°C. Quando se emprega etanol como o álcool, a temperatura está preferivelmente entre 65 e 100°C. Condições apropriadas podem ser encontradas nos exemplos comparativos 1 e 2 conforme revelado na EP-A-0544205.

 Outra concretização da etapa de conversão (a)
20 compreende um aperfeiçoamento da concretização anterior e compreende adição do álcool como um líquido ou um gás à mistura de reação enquanto destilando o álcool e a água da reação (por exemplo, conforme descrito na EP-A-0544205).

 Uma concretização altamente preferida da etapa de
25 conversão (a) e que resulta em uma mistura compreendendo o éster metílico da cadeia lateral compreende as etapas que se seguem:

 1. Refluxo da mistura de reação compreendendo uma cadeia lateral livre selecionada do grupo consistindo em D-fenilglicina e D-diidro-fenilglicina, metanol e um ácido
30

forte tal como ácido sulfúrico por um determinado tempo, por exemplo, entre meia hora e cinco horas, preferivelmente entre uma hora e três horas, mais preferivelmente entre uma 1,5 e 2,5 horas a uma temperatura entre 20 e 120°C, mais 5 preferivelmente entre 20 e 100°C, mais preferivelmente entre 40 e 100°C, mais preferivelmente entre 60 e 80°C; seguido por:

2. Concentração da mistura a uma temperatura entre 40 e 100°C, preferivelmente entre 60 e 90°C, mais 10 preferivelmente entre 70 e 80°C. A pressão durante esta etapa pode ser inicialmente a atmosférica e pode ser reduzida durante a etapa de concentração para preferivelmente 5 kPa ou menos, mais preferivelmente para 4 kPa ou menos, mais preferivelmente para 3 kPa ou menos e 15 mais preferivelmente para 2 kPa ou menos. A etapa de concentração continua até mais de 30% da água presente antes da etapa de concentração serem removidos, preferivelmente mais de 40% da água serem removidos, preferivelmente mais de 50% da água serem removidos, 20 preferivelmente mais de 70% da água serem removidos, preferivelmente mais de 80% da água serem removidos e mais preferivelmente mais de 90% da água serem removidos.

3. Adição de metanol, preferivelmente uma quantidade de modo a obter o volume inicial da mistura de 25 reação antes da etapa de concentração ou uma quantidade que seja inferior ao volume inicial da mistura de reação, por exemplo, $\leq 90\%$ ou $\leq 80\%$ ou $\leq 70\%$ ou $\leq 60\%$ ou $\leq 50\%$ ou $\leq 40\%$ ou $\leq 30\%$ ou $\leq 20\%$ do volume inicial da mistura de reação. A quantidade de metanol adicionada pode também ser superior 30 ao volume inicial da mistura de reação.

4. Repetição opcional das etapas 1-3 uma ou mais vezes, preferivelmente uma vez, preferivelmente 2 vezes, mais preferivelmente 3 vezes, mais preferivelmente 4 vezes, mais preferivelmente 5 vezes, mais preferivelmente 6 vezes, mais preferivelmente 7 vezes, mais preferivelmente 8 vezes, mais preferivelmente 9 vezes, mais preferivelmente 10 vezes. Foi verificado que quando da repetição destas etapas a "taxa" conforme definida anteriormente no presente documento, de formação do éster metílico aumentou significativamente. Por exemplo, após realização das etapas (a) - (c) apenas uma vez, uma "taxa" entre 75-85% pode ser obtida, após repetição das etapas (a) - (c) uma vez, uma "taxa" entre 85-95% pode ser obtida, e após repetição das etapas (a) - (c) 2 vezes, uma "taxa" entre 95-97% pode ser obtida, e após repetição das etapas (a) - (c) 3 vezes, uma "taxa" entre 97-98% pode ser obtida e após repetição das etapas (a) - (c) 4 vezes, uma "taxa" entre 98-99% pode ser obtida e após repetição das etapas (a) - (c) 5 vezes, uma "taxa" entre 99-99,5% pode ser obtida e após repetição das etapas (a) - (c) mais de 5 vezes a "taxa" de mais de 99,5% pode ser obtida.

Outra concretização altamente preferida da etapa de conversão (a) e que resulta em uma mistura compreendendo o éster etílico da cadeia lateral compreende as etapas que se seguem:

1. Refluxo da mistura de reação compreendendo uma cadeia lateral livre selecionada do grupo consistindo em D-fenilglicina e D-diidro-fenilglicina, etanol e um ácido forte, tal como, ácido sulfúrico por um determinado tempo, por exemplo, entre meia hora e cinco horas, preferivelmente

entre uma hora e três horas, mais preferivelmente entre uma hora e meia e duas horas e meia a uma temperatura entre 20 e 120°C, mais preferivelmente entre 20 e 100°C, mais preferivelmente entre 40 e 100°C, mais preferivelmente entre 65 e 100°C; seguido por

2. Concentração da mistura a uma temperatura entre 40 e 100°C, preferivelmente entre 60 e 90°C, mais preferivelmente entre 70 e 80°C. A pressão durante esta etapa pode ser inicialmente a atmosférica e pode ser reduzida durante a etapa de concentração para preferivelmente 5 kPa ou menos, mais preferivelmente para 4 kPa ou menos, mais preferivelmente para 3 kPa ou menos e mais preferivelmente para 2 kPa ou menos. A etapa de concentração continua até mais de 30% da água presente antes da etapa de concentração serem removidos, preferivelmente mais de 40% de água serem removidos, preferivelmente mais de 50% de água serem removidos, preferivelmente mais de 70% de água serem removidos, preferivelmente mais de 80% de água serem removidos e mais preferivelmente mais de 90% de água serem removidos.

3. Adição de etanol, preferivelmente uma quantidade de modo a obter o volume inicial da mistura de reação antes da etapa de concentração ou uma quantidade que seja inferior ao volume inicial da mistura de reação, por exemplo, $\leq 90\%$ ou $\leq 80\%$ ou $\leq 70\%$ ou $\leq 60\%$ ou $\leq 50\%$ ou $\leq 40\%$ ou $\leq 30\%$ ou $\leq 20\%$ do volume inicial da mistura de reação. A quantidade de etanol adicionado pode também ser superior ao volume inicial da mistura de reação.

4. Repetição opcional das etapas 1-3 uma ou mais vezes, preferivelmente uma vez, preferivelmente 2 vezes,

mais preferivelmente 3 vezes, mais preferivelmente 4 vezes, mais preferivelmente 5 vezes, mais preferivelmente 6 vezes, mais preferivelmente 7 vezes, mais preferivelmente 8 vezes, mais preferivelmente 9 vezes, mais preferivelmente 10 vezes. Foi verificado que quando da repetição destas etapas a "taxa" conforme definida anteriormente no presente documento, de formação do éster etílico aumentou significativamente. Por exemplo, após realização das etapas (a) - (c) apenas uma vez, uma "taxa" entre 75-85% pode ser obtida, após repetição das etapas (a) - (c) uma vez, uma "taxa" entre 85-95% pode ser obtida, e após repetição das etapas (a) - (c) 2 vezes, uma "taxa" entre 95-97% pode ser obtida, e após repetição das etapas (a) - (c) 3 vezes, uma "taxa" entre 97-98% pode ser obtida e após repetição das etapas (a) - (c) 4 vezes, uma "taxa" entre 98-99% pode ser obtida e após repetição das etapas (a) - (c) 5 vezes, uma "taxa" entre 99-99,5% pode ser obtida e após repetição das etapas (a) - (c) mais de 5 vezes uma "taxa" de mais de 99,5% pode ser obtida.

Em todas as concretizações da etapa (a), preferivelmente, a razão molar de álcool versus cadeia lateral livre que se segue é usada: entre 3 e 25, mais preferivelmente entre 5 e 25 e mais preferivelmente entre 6 e 10. Também, em todas as concretizações da etapa (a), preferivelmente, a razão molar de ácido forte (em equivalentes, por exemplo, um mol de ácido clorídrico representa um equivalente e um mol de ácido sulfúrico representa dois equivalentes) versus cadeia lateral livre que se segue é usada: entre 0,9 e 10, mais preferivelmente entre 1 e 5 e mais preferivelmente entre 2 e 3. O versado

na técnica será capaz de otimizar as condições de reação, dependendo da cadeia lateral e do álcool selecionado sem experimentação indevida.

Antes da formação do composto semissintético de β -
5 lactama na etapa (b), a mistura obtida na etapa (a) pode ser purificada de modo a obter uma mistura com uma "taxa" alta conforme definida anteriormente no presente documento. A taxa da mistura que deve ser empregada na etapa (b) do processo da invenção é preferivelmente $\geq 85\%$, mais
10 preferivelmente $\geq 90\%$, mais preferivelmente $\geq 95\%$, mais preferivelmente $\geq 96\%$, mais preferivelmente $\geq 97\%$, mais preferivelmente $\geq 98\%$, mais preferivelmente $\geq 99\%$.

Uma concretização da etapa de purificação envolve a precipitação e remoção da cadeia lateral livre do éster da
15 cadeia lateral. Isto pode ser obtido por ajuste do pH da mistura obtida na etapa (a) para um valor entre 2 e 6,5, preferivelmente entre 2,5 e 5, mais preferivelmente entre 3 e 4 por adição de uma base apropriada, tal como NaOH, amônia, KOH. Em outra concretização, a mistura de reação
20 obtida na etapa (a) pode ser adicionada a uma quantidade apropriada de água ou a um álcool ou a uma mistura de água e álcool, seguido por ajuste do pH para um valor entre 2 e 6,5, preferivelmente entre 2,5 e 5, mais preferivelmente entre 3 e 4 por adição de uma base apropriada, tal como
25 NaOH, amônia, KOH. Após ajuste do pH para o valor desejado, o pH pode ser mantido no valor desejado por adição da base apropriada. Sob estas condições, um precipitado compreendendo a cadeia lateral livre pode ser formado. Após um período de tempo apropriado, o precipitado pode ser
30 filtrado empregando técnicas conhecidas. O filtrado

compreende o éster da cadeia lateral. De modo a ser usado diretamente na etapa (b) do processo da invenção, o pH do filtrado é trazido para um pH entre 1 e 6, preferivelmente entre 1 e 4, mais preferivelmente entre 1,5 e 3, após o que
5 o álcool ser removido por evaporação empregando técnicas conhecidas.

Outra concretização da etapa de purificação envolve a formação de um sistema de duas ou de múltiplas fases compreendendo uma fase orgânica contendo o derivado do
10 éster da cadeia lateral e uma quantidade menor da cadeia lateral livre e uma fase aquosa contendo a cadeia lateral livre e, opcionalmente, sal. Isto pode ser obtido por ajuste do pH da mistura obtida na etapa (a) para um valor entre 7,5 e 10, preferivelmente entre 8,5 e 9,5, mais
15 preferivelmente entre 8,8 e 9,2 por adição de uma base apropriada, tal como NaOH, amônia, KOH. Em outra concretização, a mistura de reação obtida na etapa (a) pode ser adicionada a uma quantidade apropriada de água, um álcool ou a uma mistura de água e álcool, seguido por
20 ajuste do pH para um valor entre 7,5 e 10, preferivelmente entre 8,5 e 9,5, mais preferivelmente entre 8,8 e 9,2 por adição de uma base apropriada, tal como NaOH, amônia, KOH. Após ajuste do pH para o valor desejado, o pH pode ser mantido no valor desejado por adição da base apropriada.
25 Opcionalmente, a água pode estar na forma de uma solução de salmoura aquosa (por exemplo, NaCl). A cadeia lateral livre também pode formar um precipitado. As várias fases no sistema de múltiplas fases podem ser separadas empregando técnicas conhecidas. Opcionalmente a fase orgânica pode ser
30 lavada com água ou uma solução de salmoura aquosa. A fase

aquosa da lavagem pode ser reciclada para uma corrente de processo apropriada, a fim de evitar perda de rendimento. Esta corrente de processo pode ser a mistura de reação conforme obtida após a etapa (a) ou após o ajuste do pH conforme descrito.

Uma concretização altamente preferida da etapa de purificação combina as duas concretizações anteriores, isto é, primeiro o ajuste do pH da mistura obtida na etapa (a) entre 2 e 6,5, preferivelmente entre 2,5 e 5, mais preferivelmente entre 3 e 4 e a filtração do precipitado formado e subsequentemente o ajuste do pH do filtrado obtido a um pH entre 7,5 e 10, preferivelmente entre 8,5 e 9,5, mais preferivelmente entre 8,8 e 9,2 e separação das várias fases no sistema de múltiplas fases obtido empregando técnicas conhecidas.

Foi verificado surpreendentemente que, nas duas concretizações anteriores, onde o sistema de múltiplas fases é formado em um pH entre 7,5 e 10, preferivelmente entre 8,5 e 9,5, mais preferivelmente entre 8,8 e 9,2, isto pode render um éster, preferivelmente selecionado do grupo consistindo em éster D-fenilglicina-metílico, éster D-fenilglicina-etílico, éster D-diidro-fenilglicina-metílico e éster D-diidro-fenilglicina-etílico, na forma de base livre, pelo que o éster possui as seguintes propriedades:

- um excesso enantiomérico preferivelmente igual ou superior a 90%, mais preferivelmente igual ou superior a 95%, preferivelmente igual ou superior a 96%, preferivelmente igual ou superior a 97%, preferivelmente igual ou superior a 98% e mais preferivelmente igual ou superior a 99%; e

• um teor de sal de preferivelmente 20% em mol ou menos, mais preferivelmente de 10% em mol ou menos, mais preferivelmente de 5% em mol ou menos, mais preferivelmente de 2% em mol ou menos, mais preferivelmente de 1% em mol ou menos, expresso como mols de sal em relação aos mols de éster.

• uma "taxa" conforme definida anteriormente no presente documento de preferivelmente $\geq 85\%$, mais preferivelmente $\geq 90\%$, mais preferivelmente $\geq 95\%$, mais preferivelmente $\geq 96\%$, mais preferivelmente $\geq 97\%$, mais preferivelmente $\geq 98\%$, mais preferivelmente $\geq 99\%$.

Na etapa (b) do processo da invenção, o composto semissintético de β -lactama é formado por combinação da mistura obtida na etapa (a), opcionalmente purificada conforme descrita anteriormente no presente documento, com um núcleo e uma enzima apropriada, preferivelmente uma enzima imobilizada, para formar o composto semissintético de β -lactama correspondente, contanto que o éster da cadeia lateral formado na etapa (a) e opcionalmente purificado não seja isolado como um intermediário sólido. A Etapa (b) pode ser realizada de acordo com qualquer um dos processos conhecidos na técnica e que foram citados anteriormente no presente documento. Por exemplo, a síntese da ampicilina pode ser realizada conforme descrito na EP-A-339751 ou WO98/56946. Da mesma forma, a síntese da cefalexina pode ser realizada conforme descrito na WO96/23796. A síntese da cefradina pode ser realizada conforme descrita no WO2005/003367 e a síntese do cefaclor pode ser realizada conforme descrita no WO2006/069984.

Após o acoplamento enzimático, o antibiótico

semissintético β -lactama pode ser recuperado empregando métodos conhecidos. Por exemplo, o reator de enzima pode ser descarregado através do crivo da parte inferior empregando agitação a montante. A suspensão de antibiótico semissintético β -lactama resultante pode então ser filtrada
5 através de um filtro de vidro.

Devido à baixa quantidade da cadeia lateral livre presente após a reação de acoplamento enzimático, cristalização do antibiótico semissintético β -lactama final
10 pode ser realizada em concentrações altas de antibiótico β -lactama, o que resulta em altos rendimentos.

Em um segundo aspecto, a invenção provê um éster, preferivelmente selecionado do grupo consistindo em éster D-fenilglicina-metílico, éster D-fenilglicina-etílico,
15 éster D-diidro-fenilglicina-metílico e éster D-diidro-fenilglicina-etílico, na forma de uma base livre, pelo que o éster possui as seguintes propriedades:

- um excesso enantiomérico, preferivelmente igual ou superior a 90%, mais preferivelmente igual ou superior a
20 95%, preferivelmente igual ou superior a 96%, preferivelmente igual ou superior a 97%, preferivelmente igual ou superior a 98% e mais preferivelmente igual ou superior a 99%; e

- um teor de sal preferivelmente de 20% em mol ou
25 menos, mais preferivelmente de 10% em mol ou menos, mais preferivelmente de 5% em mol ou menos, mais preferivelmente de 2% em mol ou menos, mais preferivelmente de 1% em mol ou menos, expresso como mols de sal em relação aos mols de éster.

- uma "taxa" conforme definida anteriormente no
30

presente documento de preferivelmente $\geq 85\%$, mais preferivelmente $\geq 90\%$, mais preferivelmente $\geq 95\%$, mais preferivelmente $\geq 96\%$, mais preferivelmente $\geq 97\%$, mais preferivelmente $\geq 98\%$, mais preferivelmente $\geq 99\%$.

5 Ficará claro ao versado na técnica que é provido um éster na forma de uma base livre apresentando qualquer valor de excesso enantiomérico listado, em combinação com qualquer valor do teor de sal listado e em combinação com qualquer valor da "taxa"

10 Em um terceiro aspecto, a invenção provê um processo para produção do éster na forma de uma base livre da invenção com as propriedades conforme definidas acima. O processo pode compreender mistura de um sal do éster da cadeia lateral com uma base em um ambiente aquoso, desta
15 forma produzindo um sistema de duas fases e separando o éster da cadeia lateral na forma de base livre da fase aquosa.

 O sal do éster da cadeia lateral pode ser qualquer sal apropriado, tal como, sal de HCl. O sal pode estar em
20 uma forma sólida ou pode estar em uma forma líquida, isto é, uma solução em água ou outro solvente apropriado, opcionalmente contendo outros ingredientes, tais como, sais. A base que é misturada com o sal do éster da cadeia lateral pode ser qualquer base, preferivelmente uma base
25 forte, tal como, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou amônia.

 No sistema de duas fases formado, a fase orgânica com o éster da cadeia lateral na forma de uma base livre preferivelmente não contém ou contém apenas níveis baixos
30 de cadeia lateral livre, isto é, a "taxa" conforme definida

anteriormente no presente documento sendo $\geq 85\%$, mais preferivelmente $\geq 90\%$, mais preferivelmente $\geq 95\%$, mais preferivelmente $\geq 96\%$, mais preferivelmente $\geq 97\%$, mais preferivelmente $\geq 98\%$, mais preferivelmente $\geq 99\%$, enquanto a fase aquosa contendo a cadeia lateral livre e opcionalmente sais preferivelmente não contém ou contém apenas níveis muito baixos do éster da cadeia lateral.

O sistema de duas fases pode ser formado conforme descrito anteriormente no presente documento de acordo com as etapas de purificação, nas quais o sistema de múltiplas fases é formado em um pH entre 7,5 e 10, preferivelmente entre 8,5 e 9,5, mais preferivelmente entre 8,8 e 9,2.

As várias fases no sistema de múltiplas fases podem ser separadas empregando técnicas conhecidas. Métodos apropriados são aqueles que fazem uso da diferença de densidade entre as várias fases. Dependendo da escala, a separação pode ser obtida empregando gravidade normal ou, preferivelmente empregando forças centrífugas, tanto no modo de batelada quanto mais preferivelmente no modo contínuo. Um processo de centrifugação contínua preferido é descrito em detalhes na figura 1 e Exemplo 4 para PGM. Este processo pode ser aplicado a qualquer éster, preferivelmente selecionado do grupo consistindo em éster D-fenilglicina-metílico, éster D-fenilglicina-etílico, éster D-diidro-fenilglicina-metílico e éster D-diidro-fenilglicina-etílico, na forma de uma base livre.

Figura 1

A. Um recipiente contendo uma solução PGM, obtida conforme descrito no exemplo 4.

B. Um recipiente contendo uma solução de NaOH (65

g/kg de solução) e NaCl (211 g/kg de solução) em água (724 g/kg de solução). O conteúdo do recipiente é mantido entre 3 e 5°C.

5 C. Um recipiente de vidro de 10 litros equipado com um agitador, chicanas, termômetro, medidor de pH, uma entrada para a solução de PGM, uma entrada para a solução de NaOH/NaCl e uma saída para a mistura de reação. O recipiente é colocado em um banho de resfriamento.

10 D. Um trocador de calor (volume interno de 1 litro) para elevar a temperatura da mistura de reação para 30°C antes da introdução nas centrífugas.

E. Um recipiente contendo uma solução a 25% (peso/peso) de Na_2SO_4 . O conteúdo do recipiente foi aquecido para 30°C.

15 F. Duas centrífugas de extração Robatel BXP130 (extratores líquido/líquido, diâmetro da cuba de 125 mm, volume da cuba de 1,4 litros, diâmetro do vertedouro de fase leve de 61 mm, diâmetro do vertedouro de fase pesada de 66 mm). As entradas e saídas da centrífuga foram
20 conectadas como se segue:

- a mistura de reação do recipiente de 10 litros foi introduzida na entrada de fase leve da centrífuga 1,

- a solução a 25% (peso/peso) de Na_2SO_4 foi introduzida na entrada de fase pesada da centrífuga 2,

25 • a saída de fase pesada da centrífuga 1 foi conectada ao recipiente de recepção (G). Após o experimento o conteúdo foi descartado,

- a saída de fase leve da centrífuga 1 foi conectada à entrada de fase leve da centrífuga 2,

30 • saída de fase pesada da centrífuga 2 foi

conectada à entrada de fase pesada da centrífuga 1,

• a saída de fase leve da centrífuga 2 foi bombeada, por meio da bomba peristáltica, através de um trocador de calor para resfriar esta corrente de processo para 3-5°C.

G. Recipiente de recepção para coleta da fase aquosa da centrífuga 1,

H. Trocador de calor para resfriar a corrente de processo para 3-5°C,

I. Recipiente, mantido resfriado a 3-5°C para coleta de PGM, base livre.

Não são ilustradas na figura 1 as seguintes bombas peristálticas:

• uma bomba peristáltica para bombear a solução de PGM para o recipiente de 10 litros,

• uma bomba peristáltica para bombear a solução de NaOH/NaCl para o recipiente de 10 litros. O fluxo desta bomba foi controlado pelo medidor de pH,

• uma bomba peristáltica para bombear a mistura de reação via o trocador de calor para as centrífugas,

• uma bomba peristáltica para bombear a solução a 25% (peso/peso) de Na₂SO₄ para as centrífugas.

EXEMPLOS

Exemplo 1

a) Síntese de uma solução do éster fenilglicina-metílico (PGM)

Noventa gramas de D-fenilglicina foram suspensos em 170 mL de metanol e 73,2 g de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados. A mistura foi mantida ao refluxo por duas horas aproximadamente a 73°C e concentrada a uma

pressão reduzida empregando uma bomba a vácuo. A pressão caiu da atmosférica para 2 kPa, enquanto, ao mesmo tempo, a temperatura da mistura de reação aumentou de 40 para 80°C.

Cento e setenta mililitros de metanol foram adicionados e a mistura foi mantida novamente ao refluxo por duas horas e concentrada a uma pressão reduzida. Novamente, 170 mL de metanol foram adicionados e a mistura foi mantida ao refluxo por duas horas e concentrada a uma pressão reduzida. Finalmente, 125 mL de metanol foram adicionados. Neste estágio, a "taxa" conforme definida anteriormente no presente documento foi de 95%.

A solução foi dosada em um segundo reator, que havia sido pré-carregado com 20 mL de metanol, em uma hora a 20°C. O pH foi mantido a 3,5 com amônia. Um sólido foi formado tendo sido removido por filtração. O licor principal resultante foi diluído com 25 mL de água e concentrado a uma pressão reduzida ($p = 20$ mm Hg, $T = 40-45^{\circ}\text{C}$). Finalmente 207,5 g de solução de éster D-fenilglicina-metílico (PGM) foram obtidos. A "taxa" da solução resultante foi de 99%.

b) Síntese enzimática de cefalexina

Um reator com um crivo na parte inferior de 175 μm foi cheio com 15 g de PenG acilase imobilizada, mutante, Phe-B24-Ala de *Escherichia Coli*. Subsequentemente 21,4 g de 7-ADCA e 95 g de água foram adicionados a 25°C e o pH foi ajustado para 7,0 com amônia a 25%.

Trinta e oito gramas da solução de PGM conforme obtida na etapa a) (acima) foram dosados dentro do reator a uma taxa constante em 120 minutos. O pH foi mantido a 7,0 com amônia. A temperatura foi mantida a 25°C. Após 30

minutos, foi adicionado 0,25 g de cefalexina sólida (sementes). A cristalização da cefalexina teve início em 45 minutos. De 120 a 150 minutos, o pH foi mantido a 7,0 com ácido sulfúrico a 25%. Subsequentemente o pH foi diminuído para 5,7 com ácido sulfúrico a 25%.

c) Recuperação da cefalexina

O reator foi descarregado através do crivo na parte inferior com agitação a montante. A suspensão de cefalexina resultante foi filtrada através de um filtro de vidro. O licor principal resultante foi transferido de volta para o reator. A sequência de etapas foi repetida cinco vezes. Subsequentemente, a enzima foi lavada com 2 x 10 mL de água. Desta forma $\geq 98\%$ de cefalexina foram separados do biocatalisador sólido.

O bolo umectado de cefalexina, licor principal e água da lavagem foram combinados e a temperatura foi mantida a 2°C. Os pHs do bolo umectado combinado e dos licores principais foram diminuídos 1,5 com ácido sulfúrico concentrado e a solução resultante foi filtrada através de um filtro de 0,45 μm .

Um reator de cristalização foi cheio com 20 g de água e 1,0 g de cefalexina (sementes). A solução de cefalexina ácida mencionada acima foi dosada dentro do reator de cristalização em 80 minutos a 30°C. O pH foi mantido a 5,0 com amônia. Subsequentemente, a suspensão foi agitada a 20°C por mais 30 minutos. A suspensão foi filtrada através de um filtro de vidro e o bolo umectado foi lavado com 2 x 15 mL de água e 2 x 15 mL de acetona. Após secagem, 32,6 g de monohidrato de cefalexina foram obtidos (pureza $> 99,8\%$).

Exemplo 2**a) Síntese da solução do éster D-diidrofenilglicina metílico (DHPGM)**

Noventa gramas de D-diidro-fenilglicina (DHPG) foram suspensos em 200 mL de metanol e 73,2 g de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados. A mistura foi mantida ao refluxo por duas horas aproximadamente a 73°C e concentrada a uma pressão reduzida empregando uma bomba a vácuo. A pressão caiu da atmosférica para 2 kPa enquanto, ao mesmo tempo, a temperatura da mistura de reação aumentou de 40 para 80°C.

Cento e setenta mililitros de metanol foram adicionados e a mistura foi mantida novamente ao refluxo por duas horas e concentrada a uma pressão reduzida. Novamente, 170 mL de metanol foram adicionados e a mistura foi mantida ao refluxo por duas horas e concentrada a uma pressão reduzida. Finalmente, 125 mL de metanol foram adicionados. Neste estágio, a "taxa" conforme definida anteriormente no presente documento foi de 94,8%.

A solução foi dosada em um segundo reator, que havia sido pré-carregado com 20 mL de metanol, em uma hora a 20°C. O pH foi mantido a 3,5 com amônia. Um sólido foi formado tendo sido removido por filtração. O licor principal resultante foi diluído com 25 mL de água, descolorido com 3 g de carvão (carvão ativado) e concentrado a uma pressão reduzida ($p = 20$ mm Hg, $T = 40-45^{\circ}\text{C}$). Finalmente 217,6 g da solução de DHPGM foram obtidos. A "taxa" da solução resultante foi de 99,2%.

b) Síntese enzimática de Cefradina

Esta etapa foi realizada conforme descrito no

WO2005/003367.

Exemplo 3

a) Síntese de uma solução do éster D-fenilglicina-metílico (PGM)

5 Noventa gramas de D-fenilglicina foram suspensos em
170 mL de metanol e 73,2 g ácido sulfúrico concentrado
foram adicionados. A mistura foi mantida ao refluxo por
duas horas aproximadamente a 73°C e concentrada a uma
pressão reduzida empregando uma bomba a vácuo. A pressão
10 caiu da atmosférica para 2 kPa enquanto, ao mesmo tempo, a
temperatura da mistura de reação aumentou de 40 para 80°C.

 Cento e setenta mililitros de metanol foram
adicionados e a mistura foi mantida novamente ao refluxo
por duas horas e concentrada a uma pressão reduzida.
15 Novamente, 170 mL de metanol foram adicionados e a mistura
foi mantida ao refluxo por duas horas e concentrada a uma
pressão reduzida. Finalmente, 125 mL de metanol foram
adicionados. Esta mistura foi denominada mistura de
esterificação.

20 A maior parte da mistura de esterificação (cerca de
95%) foi dosada em um segundo reator, que havia sido pré-
carregado com 40 mL de água, em uma hora a 25-30°C. O pH
foi mantido a 3,5 com 8 M de NaOH (consumo de 34 g). Um
sólido foi formado tendo sido removido por filtração. O
25 licor principal resultante foi combinado com mistura de
esterificação (cerca de 5%) para reduzir o pH do filtrado
para pH = 2. A mistura foi concentrada a uma pressão
reduzida (p = 20 mm Hg, T = 40-45°C). Finalmente 190 g da
mistura viscosa foram obtidos.

30 **b) Preparação de 2 M de NaOH em 5 M de NaCl**

Oitenta gramas de NaOH foram dissolvidos em 149 mL de água. A solução foi diluída para 1.000 mL por adição de 5 M de NaCl. Cerca de 840 mL de 5 M de NaCl foram necessários para ajustar o volume para 1.000 mL.

5 **c) Síntese de PGM como uma base livre**

A mistura viscosa conforme obtida em a) foi misturada com 120 mL de 5 M de NaCl a 40°C. Esta mistura foi adicionada no curso de 20 minutos a 50 mL de 5 M de NaCl, enquanto o pH foi mantido a pH = 9 por adição de 2 M de NaOH em 5 M de NaCl. A temperatura da mistura foi mantida a 20°C. A mistura foi transferida para um funil de separação e a mistura foi deixada assentar por 20 minutos. Subsequentemente as camadas foram separadas. A camada superior foi misturada com 120 mL de 5 M de NaCl a temperatura ambiente. A mistura foi transferida para um funil de separação e deixada assentar por 20 minutos. As camadas foram separadas. A camada superior foi centrifugada a 5.000 rpm. Uma camada inferior menor foi formada tendo sido removida do produto oleoso. 95 g de base livre, PGM, foram obtidos. Ensaio: 85%; excesso enantiomérico = 97%; Rendimento com base na entrada de PG na etapa (a): 82%. Ensaio de PG na base livre, PGM: 0,2% (isto é, uma "taxa" de 99,8%).

d) Síntese de Ampicilina

25 Esta etapa foi realizada conforme descrito no WO98/56946 para a síntese de ampicilina a partir de 6-APA e de PGA, isto é, o derivado de amida de PG ao invés do éster metílico.

Exemplo 4

30 **Síntese de uma solução do éster D-fenilglicina-**

metílico (PGM)

Cento e trinta e cinco gramas de D-fenilglicina foram suspensos em 252 mL de metanol e 107 g de ácido sulfúrico concentrado (98%) foram adicionados. A mistura
5 foi mantida ao refluxo por duas horas aproximadamente a 73°C e concentrada a uma pressão reduzida empregando uma bomba a vácuo. A pressão caiu da atmosférica para 2 kPa enquanto, ao mesmo tempo, a temperatura da mistura de reação aumentou de 40 para 80°C. 126 mL (100 g) de metanol
10 foram adicionados, a mistura foi mantida ao refluxo por uma hora aproximadamente a 81°C e concentrada, conforme descrito anteriormente

O procedimento foi repetido por mais quatro vezes (adição de metanol, refluxo e concentração). Finalmente,
15 126 mL de metanol foram adicionados; a solução foi refluxada por mais uma hora e resfriada para temperatura ambiente.

Quinze mililitros de amônia foram dosados com taxa constante em 35 minutos até pH 2,3-2,4. 75 mL de água foram
20 adicionados. Metanol foi destilado em pressão reduzida e uma temperatura abaixo de 50°C. O pH da solução de PGM final foi de 2,0 e a "taxa" foi de 99,0%.

Exemplo 5

Produção de base livre, PGM, por emprego de
25 **centrífugas de extração em contracorrente**

A linha de processo, conforme ilustrada na figura 1, foi operada como se segue:

- As centrífugas foram iniciadas e operadas a 2.400 rpm.
 - Solução a 25% (peso/peso) de Na_2SO_4 foi
- 30

introduzida na centrífuga 2 com uma taxa de fluxo de 7,5 kg/h. A mistura de reação (vide abaixo) foi introduzida na centrífuga 1, após existir fluxo da saída de fase pesada da centrífuga 1.

5 • 1.000 mL de 5,3 M de NaCl foram adicionados ao recipiente de 10 litros.

 • O conteúdo do recipiente de 10 litros foi resfriado para 8-10°C.

 • A solução de PGM foi introduzida no recipiente de
10 10 litros com um fluxo de 15 kg/h.

 • O pH no recipiente de 10 litros foi mantido em pH = 9,7 por adição de solução de NaOH/NaCl.

 • O volume no recipiente de 10 litros foi mantida a
5 litros por ajuste do fluxo da mistura de reação fora do
15 recipiente.

 • A temperatura no recipiente de 10 litros foi mantida a 8-10°C.

 • A mistura de reação do recipiente de 10 litros foi bombeada através de um trocador de calor e desta forma
20 aquecida até 30°C. Subsequentemente a mistura de reação foi introduzida na centrífuga 1.

 • A fase leve da centrífuga 2 foi resfriada através de um trocador de calor para 3-5°C e armazenada em um recipiente a 3-5°C.

25 • A fase leve foi aplicada na conversão da ampicilina em menos de 4 horas após a produção da fase leve.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a síntese de um composto semissintético de β -lactama a partir de um núcleo e uma cadeia lateral selecionada do grupo consistindo em D-fenilglicina e D-diidro-fenilglicina na forma de um éster da cadeia lateral e uma enzima catalisando o acoplamento do éster da cadeia lateral em relação ao núcleo, caracterizado pelo fato de que o éster da cadeia lateral não é isolado como um intermediário sólido.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende a formação do éster da cadeia lateral, onde o éster da cadeia lateral não é isolado como um intermediário sólido.

3. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a. conversão de uma cadeia lateral livre selecionada do grupo consistindo em D-fenilglicina e D-diidro-fenilglicina com um álcool para formar uma mistura compreendendo o éster da cadeia lateral correspondente;

b. formação do composto semissintético de β -lactama por combinação da mistura obtida na etapa a) com um núcleo e a enzima para formar o composto semissintético de β -lactama, contanto que o éster da cadeia lateral formado na etapa (a) não seja isolado como um intermediário sólido.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a mistura obtida na etapa (a) é purificada antes da formação do composto semissintético de β -lactama na etapa (b).

5. Processo, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que o núcleo é selecionado do grupo consistindo em ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), ácido 7-amino-deacetóxicafalosporânico (7-ADCA), ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) e 7-amino-3-cloro-3-cefem-4-carboxilato (7-ACCA).

6. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que o composto semissintético de β -lactama é selecionado do grupo consistindo em ampicilina, cefalexina, cefradina e cefaclor.

7. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que o álcool é metanol ou etanol, preferivelmente metanol.

8. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que a enzima é uma penicilina G acilase, preferivelmente em uma forma imobilizada.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a penicilina G acilase é proveniente de *Escherichia coli*.

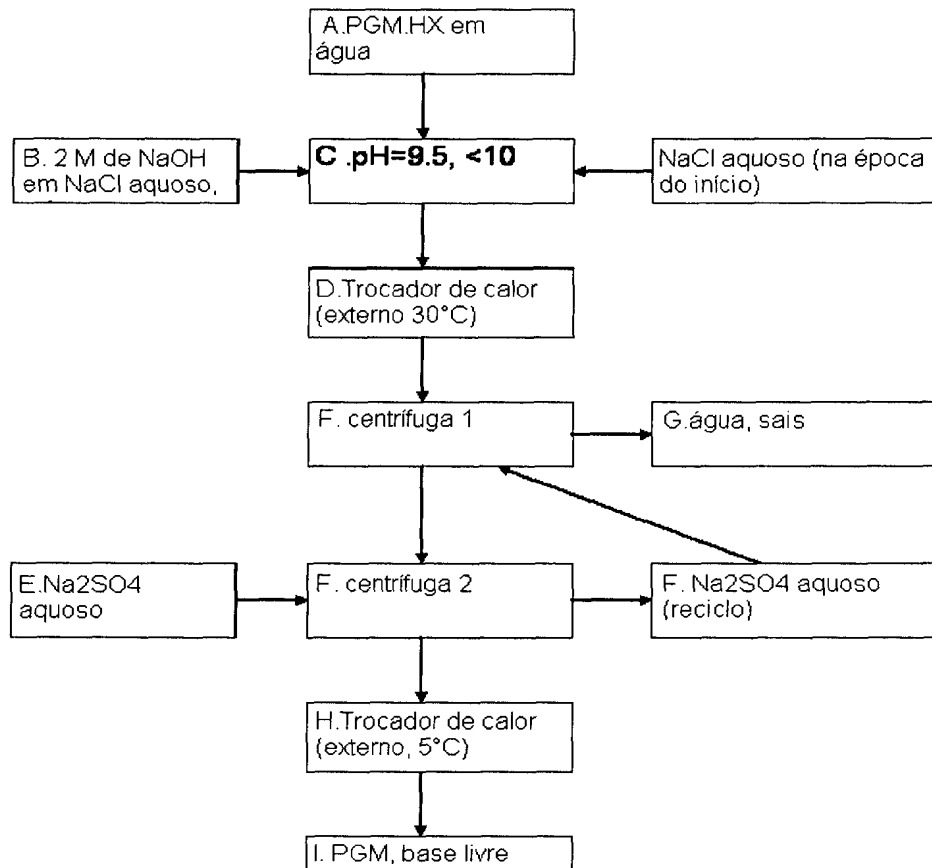
10. Preparação caracterizada pelo fato de que compreende um éster de uma cadeia lateral selecionada do grupo consistindo em D-fenilglicina e D-diidro-fenilglicina pelo que o éster da cadeia lateral está na forma de uma base livre e apresenta um excesso enantiomérico igual ou superior a 90%, pelo que a preparação possui um teor de sal preferivelmente de 20% em mol, em relação ao éster da cadeia lateral ou menos e uma "taxa" de preferivelmente $\geq$ 85%.

11. Preparação, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que compreende um éster selecionado do grupo consistindo em éster D-fenilglicina-metílico, éster D-fenilglicina-etílico, éster D-diidro-fenilglicina-metílico e éster D-diidro-fenilglicina-etílico.

12. Processo para produção do éster de qualquer uma das reivindicações 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que compreende:

- 10 • mistura de um sal do éster da cadeia lateral com uma base em um ambiente aquoso, desta forma produzindo um sistema de duas fases e
- separação do éster da cadeia lateral na forma de base livre da fase aquosa, preferivelmente por
- 15 centrifugação, mais preferivelmente, por centrifugação contínua.

Figura 1/1



RESUMO**PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE
BETA-LACTAMA**

A presente invenção descreve um processo para a
5 síntese de um composto semissintético de β -lactama a partir
de um núcleo e uma cadeia lateral selecionada do grupo
consistindo em D-fenilglicina e D-diidro-fenilglicina na
forma de um éster da cadeia lateral e uma enzima
catalisando o acoplamento do éster da cadeia lateral, em
10 relação ao núcleo caracterizado pelo fato de que o éster da
cadeia lateral não é isolado como um intermediário sólido.