



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 26.04.72 (P. 194316)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 15.05.73

Opis patentowy opublikowano: 15.12.1978

Int. Cl.² C07D 501/60

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Snam Progetti S.p.A. Mediolan (Włochy)

Sposób wytwarzania półsyntetycznych cefalosporyn

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania półsyntetycznych cefalosporyn. Określenie „cefalosporyny naturalne” oznacza w niniejszym opisie cefalosporyny wytwarzane metodą biologiczną w obecności odpowiednich prekursorów.

Sposób według wynalazku stosuje się np. do wytwarzania kwasu 7-aminocefalosporanowego i otrzymywania następnie z niego, również za pomocą enzymów, nowych cefalosporyn półsyntetycznych odpornych na działanie β -laktamazy i posiadających szeroki zakres działania.

Znane jest zastosowanie kwasu 7-aminocefalosporanowego jako surowca do produkcji cefalosporyn półsyntetycznych. Sposób otrzymywania kwasu 7-aminocefalosporanowego na drodze bezpośredniej fermentacji bez prekursorów jest skomplikowany i mało wydajny. Metody chemiczne wymagają specjalnej technologii ze względu na nietrwałość surowców wyjściowych i produktu końcowego powodującą ich rozkład i znaczne straty.

W znanej metodzie enzymatycznej używa się komórek odpowiednich mikroorganizmów wytwarzających acylazę penicylinową. Ponieważ komórki te mogą być użyte tylko jednorazowo i to w stosunkowo wysokim stężeniu niezbędnym dla skrócenia czasu hydrolizy, trzeba ciągle przygotowywać nowe ich porcje.

Ekstrakcja produktu hydrolizy, to znaczy kwasu 7-aminocefalosporanowego z mieszaniny reakcyjnej jest skomplikowanym problemem. Otrzy-

2

muje się przy tym kwas wymagający powtórnej krystalizacji i często zawierający materiał białkowy, który o ile nie zostanie usunięty, np. poprzez enzymatyczny rozkład przy użyciu enzymów proteolitycznych, wywołuje odczyny alergiczne po podaniu otrzymanych z niego cefalosporyn. Ponadto to oczywiście produkuje i komplikuje technologię wytwarzania.

Stwierdzono, że preparaty enzymatyczne osadzone na włóknistej żywicy zachowują swoją aktywność w ciągu długiego okresu używania. W czasie prób utrzymywały one prawie nie zmniejszoną aktywność w ciągu 12 miesięcy używania.

Sposób enzymatycznego wytwarzania półsyntetycznych cefalosporyn według wynalazku polega na tym, że naturalną cefalosporynę w roztworze wodnym o stężeniu 1—6% (waga/objętość), korzystnie 2—3%, poddaje się enzymatycznej hydrolizie pod wpływem preparatu enzymatycznego osadzonego na żywicy o strukturze włóknistej przy wartości pH około 8 w temperaturze do 60°C, korzystnie 37—40°C, otrzymany produkt hydrolizy wydziela się i w postaci roztworu wodnego o stężeniu powyżej 1%, korzystnie 1—3% wprowadza do strefy syntezy, w której poddaje się go enzymatycznej kondensacji z odpowiednim kwasem karboksylowym lub jego pochodną korzystnie amidem lub N-acylopochodną glicyny. Syntezę prowadzi się utrzymując pH około 6, w temperaturze do 60°C, korzystnie 37—40°C.

Wybór kwasu zależy od tego jaką cefalosporynę półsyntetyczną chce się otrzymać. Anion kwasu karboksylowego musi zawierać grupę zgodną z rodzajem otrzymywanej cefalosporyny. Preparat enzymatyczny umieszczony w strefie reakcji osadzony jest na włóknistej żywicy, przy czym stosuje się enzym albo znajdujący się w surowym ekstrakcie otrzymanym z komórek grzybów, promieniowców lub bakterii albo wydzielony z tych źródeł.

Enzymy wykorzystywane w tym przypadku wytwarzane są przez grzyby lub promieniowce (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Streptomyces* i podobne) i te są specyficzne dla rozszczepiania cefalosporyny fenoksymetylowej lub przez bakterie (*E. Coli*, *B. Megaterium*, *Aerobacter Aerogenes*, *Alcaligenes faecalis* i inne podobne), specyficzne dla rozszczepiania cefalosporyny benzylowej.

Do polimerów na których można osadzać enzym należą: polimery estrów i azotanów celulozy, poliolefiny, polimery i kopolimery otrzymywane z akrylonitrylu, akrylanów, metakrylanów, estrów winylowych, chlorku winylu, chlorku winylidenu, styrenu oraz poliamidy, poliwinylbutyral i podobne. Włóknisty preparat enzymatyczny otrzymuje się z lepkiej masy, składającej się z enzymu i łatwo tworzącego włókna polimeru.

Nierozpuszczalny preparat enzymatyczny otrzymuje się w sposób opisany w patencie włoskim nr 836 462. Według tego patentu włóknista żywica z osadzonym enzymem przygotowywana jest z roztworu polimeru zdolnego do wytwarzania struktury włóknistej, w którym zdyspergowany jest preparat enzymatyczny. Z uzyskanej w taki sposób emulsji można na mokro lub sucho otrzymywać włókna posiadające wewnątrz bardzo małe pory, w których osadzony jest enzym osłonięty bardzo cienką membraną zapobiegającą ucieczce enzymu do środowiska reakcji ale z drugiej strony pozwalającą na oddziaływanie katalityczne.

Sposobem według wynalazku otrzymuje się również kwas 7-aminocefalosporanowy, przy czym cefalosporynę poddaje się działaniu hydrolitycznemu preparatu enzymatycznego, przygotowanego w sposób opisany powyżej, a następnie z mieszaniny reakcyjnej wydziela się kwas 7-aminocefalosporanowy.

Podczas hydrolizy prowadzącej do otrzymywania kwasu 7-aminocefalosporanowego stosuje się roztwory soli odpowiedniej cefalosporyny o stężeniu od 1 do 6% (waga na objętość), korzystnie 2—3%. Kwas 7-aminocefalosporanowy lub jego sól poddaje się za pomocą preparatu enzymatycznego, reakcji kondensacji z kwasem karboksylowym amidem lub N-acylopochodną glicyny przy czym wymieniony produkt hydrolizy cefalosporyny wprowadza się do strefy syntezy w stężeniu korzystnie 1—3% (waga na objętość), a w strefie syntezy utrzymuje się wartość pH wynoszącą około 6.

W celu wytworzenia kwasu 7-aminocefalosporanowego do strefy hydrolizy wprowadza się sól potasową kwasu 7-(2-feniloacetamido)-cefalosporanowego, a w celu otrzymania kwasu 7-aminode-

zoksyacetylofalo-sporanowego do strefy hydrolizy wprowadza się sól potasową kwasu 7-(2-feniloacetamido)dezoksyacetylofalo-sporanowego, natomiast w celu otrzymania kwasu 7-(2-D- α -aminofeniloacetamido)cefalosporanowego do strefy kondensacji wprowadza się mieszaninę soli potasowej kwasu 7-aminocefalosporanowego i chlorowodoru estru metylowego D- α -fenyloglicyny.

Przedłużona aktywność nierozpuszczalnych preparatów enzymatycznych upraszcza proces, a także obniża koszt przygotowywania enzymu w kosztach ogólnych procesu do wysokości nie mającej praktycznie żadnego znaczenia. Sposób będący przedmiotem wynalazku pozwala z jednej strony na enzymatyczne rozszczepianie antybiotyków z grupy cefalosporyn naturalnych, z drugiej zaś na otrzymywanie w prowadzonym w analogiczny sposób procesie pochodnych cefalosporyn.

Żywica z osadzonym enzymem, po zakończeniu procesu koagulacji i nadaniu jej struktury włóknistej, przemywana jest w celu usunięcia zaadsorbowanych zanieczyszczeń białkowych, które mogłyby przedostać się do środowiska i może być używany do katalizowania reakcji. Otrzymuje się w ten sposób produkt o wysokiej czystości pozbawiony całkowicie zanieczyszczeń białkowych stwarzających niebezpieczeństwo wywoływania odczynów alergicznych.

Nierozpuszczalny preparat enzymatyczny może być używany w sposób periodyczny, wtedy po hydrolizie penicyliny mieszaninę reakcyjną usuwa się i zastępuje świeżą porcją.

Te same katalizatory enzymatyczne można wykorzystywać w procesie ciągłym stosując kolumnę. W tym przypadku buforowany roztwór cefalosporyny przepuszcza się przez kolumnę wypełnioną preparatem enzymatycznym. Utrzymuje się przy tym wartość pH 8 dodając w sposób automatyczny roztwór zasady. Zachowując odpowiednią szybkość przepływu i stosując odpowiednią ilość preparatu enzymatycznego otrzymuje się po wyjściu z kolumny mieszaninę o wysokim stopniu hydrolizy. Te same enzymy w środowisku kwaśnym katalizują acylację kwasu 7-aminocefalosporanowego, co umożliwia enzymatyczną syntezę nowych cefalosporyn. Możliwa jest więc, przy zastosowaniu tej samej jak podczas hydrolizy aparatury, synteza cefalosporyn półsyntetycznych w mieszaninie zawierającej kwas 7-aminocefalosporanowy i odpowiedni kwas karboksylowy lub korzystnie bardziej aktywną jego pochodną, np. amid lub N-acylopochodną glicyny.

Przykład I. 20 g trójoctanu celulozy (Fluka) rozpuszczono podczas mieszania w 280 ml chlorku metylenu (C. Erba). Osobno przygotowano roztwór enzymu dodając 60 g (wilgotny produkt) komórek otrzymanych z fermentacji *E. Coli* na odpowiedniej pożywce w obecności kwasu feniloctowego, do 0,01 molarnego buforu fosforanowego o pH — 7,0. Otrzymany materiał ogrzewano w ciągu 3 minut w temperaturze 50°C, a następnie strącono siarczanem amonu przy pH 5,5 zbierając frakcje wytrącone przy 25—75% nasycenia. Frakcje te rozpuszczono w 0,01 n buforze fosfo-

ranowym o pH 8,0 zawierającym 30% objętościowych gliceryny. Otrzymany roztwór enzymu dodano do roztworu trójoctanu celulozy i emulgowano mieszając energicznie w ciągu 30 minut w temperaturze 0°C, a następnie otrzymaną emulsję wlewano do małego pojemnika i w temperaturze -6°C, ciśnieniem azotu wyciskano włókna, które koagulowano w toluenie w temperaturze pokojowej. Otrzymane włókna suszono w ciągu jednej godziny pod zmniejszonym ciśnieniem celem usunięcia toluenu.

37 g otrzymanego preparatu umieszczono w kolumnie szklanej o wymiarach 70×3 cm, zaopatrzonej w płaszcz termostatyczny i przemywano wodą oraz gliceryną do zaniku protein. Następnie przepuszczono w obiegu zamkniętym 600 ml 2% roztworu wodnego soli potasowej kwasu 7-(2-feniloacetamido)-cefalosporanowego. Utrzymywano pH 8, dodając w sposób ciągły 0,5 N roztwór NaOH. Kolumnę termostatowano w temperaturze 37°C. Po 5 godzinach uzyskano 98% hydrolizy, a otrzymany kwas 7-aminocefalosporanowy izolowano z mieszaniny reakcyjnej.

Przykład II. Powtarzając postępowanie z przykładu I przygotowano nierozpuszczalny preparat enzymatyczny ze 100 g grzybni (waga wilgotna) z fermentacji *Penicilium chrysogenum*.

30 g preparatu umieszczono w kolumnie o wymiarach 70×3 cm. Kolumnę termostatowano w temperaturze 37°C. Przepuszczono 600 ml 2% roztworu wodnego soli potasowej kwasu 7-(2-fenoksyacetamido)-cefalosporanowego. Po sześciu godzinach uzyskano 85% hydrolizy, a otrzymany kwas 7-aminocefalosporanowy izolowano z mieszaniny reakcyjnej.

Przykład III. Powtarzając postępowanie z przykładu I przez kolumnę zawierającą 37 g preparatu enzymatycznego przepuszczano 600 ml 2% roztworu wodnego soli potasowej kwasu 7-(2-feniloacetamido) - dezoksyacetylocefalosporanowego, utrzymując pH 8 i temperaturę 37°C. Po 5 godzinach osiągnięto całkowitą hydrolizę, a wydajność kwasu 7-aminodezoksyacetylocefalosporanowego wynosiła 85%.

Przykład IV. Przez kolumnę zawierającą 37 g preparatu enzymatycznego przygotowanego według przykładu I, przepuszczono 500 ml roztworu zawierającego 5 g soli potasowej kwasu 7-aminocefalosporanowego i 13,1 g chlorowodoru estru metylowego D- α -fenyloglicyny, utrzymując przy tym pH 6,5 i temperaturę 37°C. Po 1,5 godzinie 40% kwasu 7-aminocefalosporanowego uległo konwersji do kwasu 7-(D- α -aminofeniloacetamido)-cefalosporanowego.

1. Sposób wytwarzania półsyntetycznych cefalosporyn przez enzymatyczną hydrolizę i kondensację pod wpływem acylazy penicylinowej, **znamienny tym**, że naturalną cefalosporynę w roztworze wodnym o stężeniu 1—6%, korzystnie 2—3% (wagowa na objętość) poddaje się enzymatycznej hydrolizie pod wpływem acylazy penicylinowej osadzonej na polimerycznym nośniku o strukturze włóknistej, utrzymując pH około 8, w temperaturze do 60°C, korzystnie 37—40°C i otrzymany produkt hydrolizy w roztworze wodnym o stężeniu powyżej 1%, korzystnie 1—3% wagowych (waga na objętość) poddaje się enzymatycznej kondensacji pod wpływem acylazy penicylinowej osadzonej na polimerycznym nośniku o strukturze włóknistej, utrzymując pH około 6, w temperaturze do 60°C, korzystnie 37—40°C, z odpowiednim kwasem karboksylowym albo jego pochodną, korzystnie amidem albo N-acylopochodną glicyny.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do strefy hydrolizy wprowadza się buforowany roztwór cefalosporyny.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako nośnik stosuje się polimery estrów lub azotanów celulozy, poliolefiny, polimery metakrylanów, estrów winylowych, chlorku winylu, chlorku winylidenu, styrenu, poliamidy i poliwinylbutyral.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do strefy hydrolizy wprowadza się sól potasową kwasu 7-(2-feniloacetamido) - cefalosporanowego otrzymując jako produkt hydrolizy kwas 7-aminocefalosporanowy.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do strefy hydrolizy wprowadza się sól potasową kwasu 7-(2-fenoksyacetamido) - cefalosporanowego otrzymując jako produkt hydrolizy kwas 7-aminocefalosporanowy.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do strefy hydrolizy wprowadza się sól potasową kwasu 7-(2-feniloacetamido) - dezoksyacetylocefalosporanowego otrzymując jako produkt hydrolizy kwas 7-aminodezoksyacetylocefalosporanowy.

7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do strefy kondensacji wprowadza się mieszaninę soli potasowej kwasu 7-aminocefalosporanowego i chlorowodoru estru metylowego D- α -fenyloglicyny otrzymując jako produkt kwas 7-(2-D- α -aminofeniloacetamido) - cefalosporanowy.