

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

209853
(11) (B2)



ŘÁD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

(22) Přihlášeno 20 12 74

(21) [PV 8821-74]

(32) (31) (33) Právo přednosti od 20 12 73
[54484 A/73] Itálie

(40) Zveřejněno 30 01 81

(45) Vydáno 15 06 84

(51) Int. Cl.³
C 12 P 35/00

(72)

Autor vynálezu

MARCONI WALTER dr., SAN DONATO MILANESE, CECERE FRANCESCO
dr., MONTEROTONDO a MORISI FRANCO dr., SAN GIOVANNI IN

(73)

Majitel patentu

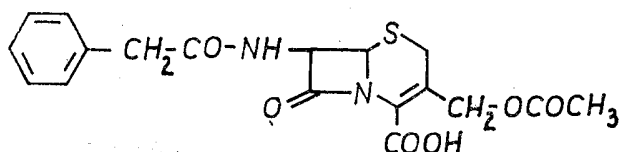
PERSICETO (Itálie)
SNAMPROGETTI S. p. A., MILÁN (Itálie)

[54] Způsob výroby polosyntetického cefalosporinu

1

2

Vynález se týká způsobu výroby polosyntetického cefalosporinu vzorce



hydrolýzou příslušného derivátu, vzniklého chemickým rozšířením kruhu penicilinu G, a následujícím použitím produktu hydrolýzy jako výchozí sloučeniny pro jeho syntetickou přeměnu na požadovaný polosyntetický cefalosporin.

Důležitost, které nabyly polosyntetické deriváty cefalosporinů v posledních letech, je obecně známa. Jsou hojně užívány ve farmakologii jako náhrada antibiotik neodolávajících účinkům β -laktamázy (cefalosporinů). Mimoto jsou dostatečně stálé v kyselém prostředí, jsou velmi dobře snášeny a mají široké spektrum antibiotické účinnosti.

Současný známý stav jejich výroby se skládá z následujících chemických stupňů:

a) rozšíření kruhu penicilinu G,

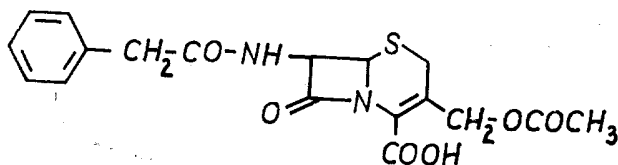
b) hydrolýzy získaného produktu,
c) izolace výchozího materiálu [kyseliny 7-desoxyacetylcefalosporanové, 7-ADCA],
d) syntézy nových sloučenin z tohoto výchozího materiálu.

V desoxyacetylderivátech získaných shora uvedeným postupem, tj. v derivátech s methylradikálem v poloze 3, lze oxidovat methylskupinu a dospět k příslušným hydroxyacetylderivátům, jejichž struktura může být vztažena ke struktuře přirozeného cefalosporinu (cefalosporinu C).

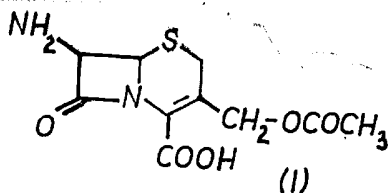
Nyní bylo nalezeno, že některé stupně těchto postupů, užívaných při přípravě polosyntetických cefalosporinů, mohou být provedeny pomocí bakteriálních buněk nebo buněčných extraktů, což přináší podstatné zlepšení, šetří výchozí surovinu, reakce je uskutečněna za mírnějších podmínek a s dob-

rými výtěžky. Buňky se kultivují obvyklým fermentačním postupem; buněčné extrakty lze snadno získat mechanickým poškozením buněk, čímž se uvolní žádaný enzym, který se parciálně přečistí.

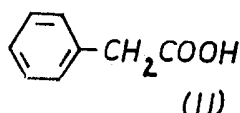
Enzymatické procesy mohou nahradit tyto chemické stupně:



hydrolýzou příslušného derivátu vzniklého chemickým rozšířením kruhu penicilinu G a následujícím použitím produktu hydrolýzy jako výchozí sloučeniny pro jeho syntetickou přeměnu na žádaný polosyntetický cefalosporin, jehož podstata spočívá v tom, že se hydrolýza derivátu penicilinu G provádí působením penicilin-acylázy z mikroorganismu *Escherichia coli*, načež se vzniklá sloučenina vzorce I



uvádí se reakce se sloučeninou vzorce II.



Způsob podle vynálezu lze provádět tak, že se hydrolýza derivátu penicilinu G provádí jeho uváděním do styku s bakteriálními buňkami *Escherichia coli* nebo s penicilin-acylázou extrahovanou a přečištěnou z buněk *Escherichia coli*.

Při způsobu podle vynálezu se s výhodou jako derivátu penicilinu G používá cefalosporinu C.

Hydrolýza se provádí s výhodou při pH v rozsahu 6 až 9 a při teplotě v rozsahu 0 až 50 °C.

Způsob podle vynálezu se s výhodou provádí tak, že se vzájemná reakce sloučenin vzorce I a II provádí při pH v rozsahu 3 až 8, a to za molárního přebytku acylačního činidla.

Hydrolytická reakce buněčnými i enzymatickými extrakty probíhá při pH 6,0 až 9,0, s výhodou při pH 8 až 8,5. Teplota se může pohybovat od 0 do 50 °C, nejvýhodnější je

a) hydrolýzu produktu získaného chemickým rozšířením kruhu benzylpenicilinu

b) chemickou acylaci získané 7-aminokyseliny, vedoucí ke konečnému produktu.

Vynálezem je tedy způsob výroby polosyntetického cefalosporinu vzorce

37 °C. Syntetická reakce se provádí v přítomnosti některého buněčného nebo enzymatického extraktu, nejlépe při pH 3,0 až 8,0, výhodně při pH 7,0.

Provedení syntézy vyžaduje přítomnosti molárního nadbytku acylačního činidla, aby byla posunuta rovnováha; molární poměr mezi acylačním činidlem a cefalosporanovou kyselinou se může pohybovat mezi 1 až 5, s výhodou je 2,5. Protože enzym katalyzuje hydrolýzu esterového nebo amidického seskupení acylačního činidla a amidické vazby produktu, je vhodné přerušit rychle reakci, když bylo dosaženo maximální koncentrace. Byly-li použity buňky, lze to provést jejich odstraněním z reakčního prostředí odstředěním, byl-li použit enzymatický extrakt snížením pH na hodnotu blízkou 2,0.

Následující příklady lépe osvětlují způsob podle vynálezu, aniž jej omezují.

Příklad 1

Escherichia coli ATCC 9637 byla fermentována v submerzní aerobní kultuře. Složení kultivačního prostředí, vyjádřené v g/l, bylo následující: masový extrakt 10, pepton 10, NaCl 5, kyselina fenylactová 2, pH bylo upraveno na hodnotu 7 a teplota udržována při 24 °C. Fermentace byla přerušena po 20 hodinách. 1 litr této kultury obsahoval průměrně množství biomasy *E. coli* schopné hydrolyzovat 40 milimolů penicilinu G během 1 hodiny při 37 °C a pH 7,8 (40 000 jednotek).

K biomase získané ze 2 l kultury (80 000 jednotek), oddělené odstředěním a promyté puřem (fosforečnan draselný) při pH 7,8, bylo přidáno za míchání 0,5 l 6 % roztoku, hmot./objem, kyseliny 7-(2'-fenylacetamido)-3-methylcef-3-em-4-karboxylové (cefalosporinu G) (90 mmol) v 0,1 M roztoku fosfatového pufru při pH 7,8 a teplotě 37 °C, pH roztoku bylo udržováno kontinuálním přidáváním roztoku hydroxidu sodného za kontroly přístroje udržujícího konstantní pH. Po 2,5 hod., když bylo spotřebováno stechiometrické množství NaOH, byla reakční směs odstředěna, filtrát ochlazen na 4 °C, přidá-

no 200 ml octanu butylnatého a pH roztoku upraveno 6N HCl na hodnotu 2,0. Hodnota pH oddělené vodní fáze byla upravena přidáním 5N NaOH na 4,6 a směs zředěna stejným množstvím ethylalkoholu.

Takto získaná sraženina byla oddělena, promyta směsí vody a ethylalkoholu (50 : 50, objem/objem) a usušena. Bylo získáno 18,7 g (87 mmol) kyseliny 7-amino-3-methylcef-3-em-4-karboxylové kyseliny 7-aminodesacetoxycefalosporanové [7-ADCA] s obsahem 95 %.

Příklad 2

Escherichia Coli byla fermentována stejně jako v příkladu 1. Biomasa získaná ze 3 l kultivačního média byla nasuspendována do Tris-HCl pufru 0,01M při pH 8,5 a zhomogenisována dvojnásobnou recyklizací v homogenizátoru zn. Manton-Gaulin při 700 kg/cm². Potom byl přidán hexadecylpyridinium chlorid do koncentrace 0,4 % a hodnota pH upravena na 4,5. Teplota udržována při 37 °C. Po třech hodinách byl odstředěn nerozpustný materiál. Penicilinová acyláza byla regenerována z čirého roztoku vysrážením síranem amonným (65 % nasycenost).

Získaná sraženina byla nasuspendována do 0,1 M fosfátového pufru s pH 7,8 a dialyzována proti 20 objemům téhož pufru. K takto získaným 500 ml dialyzovaného produktu bylo přidáno 30 g (90 mmol) cefalosporinu G a pH reakční směsi udržováno pomocí pH-statů na hodnotě 7,8. Po 2,5 hod. po skončení hydrolyze cefalosporinu G bylo izolováno, stejně jako v příkladu 1, 18,1 g 7-ADCA, výtěžek konverze byl 93 %.

Příklad 3

5 g (23,3 mmol) 7-ADCA a 10 g (50 mmol) hydrochloridu methylesteru D-(—)-fenylglycinu (PGM) bylo nasuspendováno do fosfátového pufru pH 7,0 při teplotě 25 °C a objem byl upraven na 500 ml. K takto získanému roztoku byla přidána za míchání biomasa získaná z 2 l kultury *E. Coli*, získané stejně jako v příkladu 1. Tvorba cefalexinu byla sledována spektrofotometrickou metodou (Analyst **92**, 247, 1967). Po 1 hodině byla reakce přerušena, buňky odděleny odstředěním. 550 ml roztoku obsahovalo 8 mg/ml cefalexinu (4,4 g), což odpovídá 54 % konverzi.

Příklad 4

5 g (23,3 mmol) 7-ADCA a 10 g (50 mmol) PGM bylo rozpuštěno v 500 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,0, obsahujícího množství penicilinové acylázy získané z 3 l kultury, jak je to popsáno v příkladu 2.

Po 1 hodině při 25 °C obsahoval roztok objemu 555 ml 7,8 mg/ml cefalexinu, což odpovídá 53 % konverzi 7-ADCA.

Příklad 5

5 g (23,2 mmol) 7-ADCA a 10 g (51 mmol) ethylesteru D-(—)-p-hydroxyfenylglycinu (p-OH PGE) bylo rozpuštěno v 1,5 l 0,1 M fosfátového pufru s pH 7,0 při 25 °C. K roztoku, jehož pH bylo udržováno na hodnotě 7,0, byla přidána biomasa ze 2 l kultury *E. Coli*, získané podle příkladu 1. Po 1 hodině byla reakce přerušena. Roztok obsahoval 2 mg/ml kyseliny 7beta-[2'-amino-2'-(4-hydroxyfenyl)acetamido]-3-methylcef-3-em-4-karboxylové, což odpovídá 35 % konverzi 7-ADCA.

Příklad 6

5 g (23,3 mmol) 7-ADCA a 10 g (51 mmol) p-OH PGE byly rozpuštěny v 1500 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,0 při 25 °C, obsahujícího penicilinovou acylázu, získanou ze 3 l kultury, stejně jako v příkladu 2. Po 1 hodině bylo v roztoku nalezeno 1,8 mg/ml kyseliny 7 beta-[2'-amino-2'-(4-hydroxyfenyl)acetamido]-3-methylcef-3-em-4-karboxylové, což odpovídá 32 % konverzi 7-ADCA.

Příklad 7

5 g (18,36 mmol) kyseliny 7-aminocefalosporanové 1-ACA a 10 g (50 mmol) PGM bylo rozpuštěno v 1500 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,0 při 25 °C. K roztoku byla přidána za míchání biomasa získaná z 2 litrů kultivačního média *E. Coli*. Po 1 hodině obsahoval roztok 3 mg/ml kyseliny 7-(D-alfa-aminofenylacetamido)/cefalosporanové (cefaloglycinu), což odpovídá 60% konverzi 7-ACK.

Příklad 8

5 g (18,36 mmol) 7-ACK a 10 g (50 mmol) PGM byly rozpuštěny v 1500 ml fosfátového pufru, obsahujícího penicilinovou acylázu extrahovanou ze 3 l kultury, pH roztoku bylo udržováno kontinuálním přidáváním NaOH na hodnotě 7,0, teplota při 25 °C. Po 1 hodině obsahoval roztok 3,1 mg/ml cefaloglycinu, což odpovídá 62 % konverzi 7-ACK.

Příklad 9

5 g (18,36 mmol) 7-ACK a 9,75 g (50 mmol) ethylesteru p-hydroxyfenylglycinu byly rozpuštěny v 1500 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,0 při teplotě 25 °C. K roztoku byla přidána za míchání biomasa získaná ze 2 l kultury *E. Coli*. Po 1 hodině obsahoval roztok 1,7 mg/ml kyseliny 7beta-[2'-amino-2-(4-hydroxyfenyl)acetamido]-3-hydroxymethyl(oacetát)-cef-3-em-4-karboxylové, což odpovídá 33 % konverzi 7-ACK.

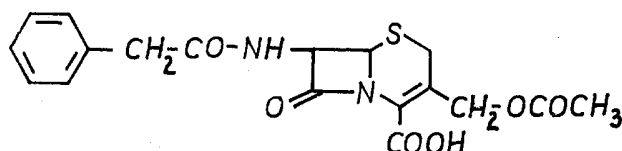
Příklad 10

Postup přípravy stejně jako v příkladu 9, biomasa nahrazena enzymatickým extrak-

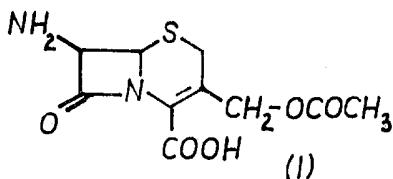
tem získaným ze 3 l kultury E. Coli. Na konci reakce byla zaznamenána 30 % konverse 7-ACK.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

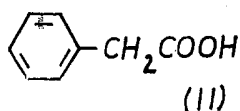
1. Způsob výroby polosyntetického cefalosporinu vzorce



hydrolýzou příslušného derivátu vzniklého chemickým rozšířením kruhu penicilinu G a následujícím použitím produktu hydrolýzy jako výchozí sloučeniny pro jeho syntetickou přeměnu na požadovaný polosyntetický cefalosporin, vyznačující se tím, že se hydrolýza derivátu penicilinu G provádí působením penicilin-acylázy z Escherichia coli, načež se vzniklá sloučenina vzorce I



uvádí do reakce se sloučeninou vzorce II.



2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se hydrolýza derivátu penicilinu G provádí jeho uváděním do styku s bakteriálními buňkami Escherichia coli.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se hydrolýza derivátu penicilinu G provádí jeho uváděním do styku s penicilin-acylázou extrahovanou a přečištěnou z buňek Escherichia coli.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako derivátu penicilinu G používá cefalosporinu C.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se hydrolýza provádí při pH v rozsahu 6 až 9.

6. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se hydrolýza provádí při teplotě v rozsahu 0 až 50 °C.

7. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se reakce provádí při pH v rozsahu 3 až 8.

8. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se reakce provádí za přítomnosti molárního přebytku acylačního činidla.