

320142 29



MEMORIA DESCRIPTIVA
que se acompaña a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

por veinte años en España, por "UN PROCEDIMIEN-

TO PARA LA PREPARACION DE PENICILINAS"

a favor de

BEECHAM GROUP LIMITED

domiciliado en Beecham House, Great West Road,

Brentford, Middlesex, Inglaterra

PRIORIDAD: Solicitud de Patente Británica nº 49.122
del 3 de Diciembre de 1964

320142

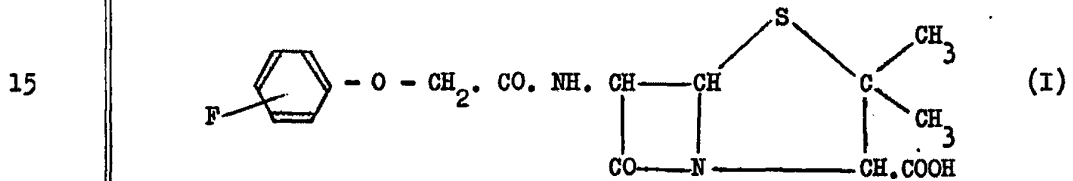
29



1 Este invento se refiere a nuevas penicilinas y particularmente
 a una nueva clase de penicilinas que son derivados del ácido 6-amino-
 penicilánico y que tienen valor como agentes antibacterianos, como su
 5 plementos nutritivos en la alimentación de animales, como agentes pa-
 ra el tratamiento de la mastitis en el ganado vacuno y como agentes
 terapéuticos en el ganado aviar y animales, incluido el hombre, espe-
 cialmente en el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas
 por las bacterias Gram positivas.

10 Las nuevas penicilinas del presente invento, además de su po-
 tente actividad antibacteriana, presentan resistencia a la destrucción
 por los ácidos y, por lo tanto, pueden administrarse por vía oral.

Según la presente invención, se facilitan nuevas penicilinas de
 fórmula general:



y sales no tóxicas de las mismas.

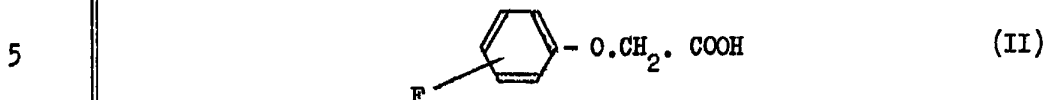
20 Las sales son no tóxicas e incluyen sales metálicas no tóxicas
 tales como sales de sodio, potasio, calcio y aluminio y sales de amo-
 nio y amonio sustituido, por ejemplo, sales de aminas no tóxicas ta-
 les como las trialquilaminas, incluidas la trietilamina, procaína, di-
 bencilamina, N-bencil-beta-fenetilamina, 1-efenamina, N,N'-dibencil -
 etilendiamina, deshidroabietilamina, N,N'-bis-deshidroabietilaten -
 diamina y otras aminas que han sido utilizadas para formar sales con
 25 la bencilpenicilina.

25



320142

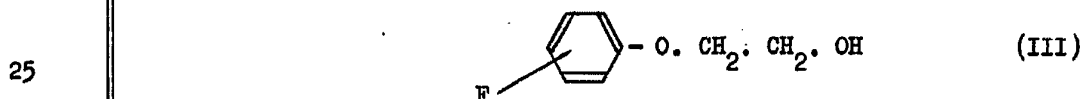
1 La presente invención proporciona además un procedimiento para la preparación de nuevas penicilinas de fórmula general (I) en la que el ácido 6-aminopenicilánico o una sal del mismo se asocia con un ácido de fórmula general:



10 La combinación del ácido 6-aminopenicilánico y el ácido fluorfenoxiacético puede realizarse mediante el empleo del cloruro de ácido, o de su equivalente funcional, como agente acilante del grupo amino primario. Tales equivalentes incluyen los correspondientes bromuros de ácido carboxílico, azidas, anhídridos de ácido y anhídridos mixtos con otros ácidos carboxílicos, incluidos los monoésteres y particularmente los ésteres alifáticos inferiores, del ácido carbónico.

15 Alternativamente, el ácido 6-aminopenicilánico puede hacerse reaccionar con los productos intermedios formados a partir del ácido fluorfenoxiacético y un agente de condensación tal como dicitclohexilcarbodi-imida o carbonildi-imidazol.

20 Las fluorfenoximetilpenicilinas de la presente invención pueden también prepararse por fermentación de Penicillium chrysogenum, u otro moho productor de penicilina, en presencia de un precursor adecuado. Son ejemplos de precursores adecuados el ácido fluorfenoxiacético (II) apropiado o una sal, éster, amida o amida sustituida del mismo y los compuestos capaces de convertirse en el ácido (II) en las condiciones de fermentación, por ejemplo, el fluorfenoxietanol apropiado.





29

320142

1 El cultivo del medio que contiene el precursor y el aislamiento
de la nueva penicilina se llevan a cabo siguiendo métodos bien conoci-
dos en la técnica. La proporción de precursor utilizada varía entre lí-
mites muy amplios, siendo conveniente que la concentración máxima se
5 encuentre alrededor del cinco por ciento y que la mínima sea la neces-
aria para producir una cantidad razonable de la nueva penicilina.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención:

EJEMPLO 1

m-Fluorfenoximetilpenicilina

10 En un baño de aceite a 75-85°, se calientan juntos, durante 2
horas, ácido m-fluorfenoxiacético (3,4 g) y cloruro de tionilo (5 ml).
El exceso de cloruro de tionilo se destila a vacío y las últimas tra-
zas del mismo se separan añadiendo benceno (5 ml) al residuo oleoso y
destilando después éste a vacío. El cloruro de ácido oleoso residual
15 se disuelve en acetona seca (40 ml) y se añade sobre una solución agi-
tada de ácido 6-aminopenicilánico (4,32 g) en una mezcla de solución
acuosa de bicarbonato sódico N/1 (60 ml) y acetona (20 ml). La solu-
ción resultante se agita a la temperatura ambiente durante 2 horas y
después se destila la acetona a temperatura baja y presión reducida.
20 La solución acuosa resultante se cubre con éter (100 ml) y se acidula
hasta pH 2, sacudiendo la mezcla, con ácido clorhídrico N/1 (40 ml).
La mezcla se filtra a través de "Dicalite" y se separan las dos capas.
La capa acuosa se acidula de nuevo hasta pH 1,5 con ácido clorhídrico
N/1 (5 ml), se vuelve a extraer con éter limpio (50 ml) y se separan
25 las dos capas. Se combinan los dos extractos etéreos, se lavan con

320142

29



1 salmuera saturada (75 ml) y después se añade con agitación una solu -
ción 1,67 N de 2-etilhexoato sódico en isobutil metil cetona (12 ml).
La penicilina cristaliza inmediatamente y se recoge por filtración al
cabo de 1 hora más. Se seca a vacío sobre pentóxido de fósforo, dando
5 la sal sódica de m-fluorfenoximetilpenicilina en forma de polvo blan-
co (6,9 g, rendimiento 89 %). La pureza del producto se calcula en el
73 % por ensayo colorimétrico con hidroxilamina.

EJEMPLO 2

p-Fluorfenoximetilpenicilina

10 El ácido p-fluorfenoxiacético se convierte en el cloruro de ácido
y después en la penicilina como en el Ejemplo 1, dando la sal sódica de
p-fluorfenoximetilpenicilina en forma de polvo blanco (rendimiento
89 %). La pureza se calcula en el 80 % por ensayo colorimétrico con
hidroxilamina.

EJEMPLO 3

o-Fluorfenoximetilpenicilina

15 El ácido o-fluorfenoxiacético se convierte en el cloruro de áci-
do y después en la penicilina como en el Ejemplo 1, dando la sal sódica
de o-fluorfenoximetilpenicilina en forma de polvo blanco (rendimien-
20 to 73 %). La pureza se calcula en el 73 % por ensayo colorimétrico con
hidroxilamina.

Las fluorfenoximetilpenicilinas de la presente invención son más
activas que la fenoximetilpenicilina (Penicilina V) frente a las infec-
ciones experimentales en ratones debidas al Staph. aureus Smith y al
25 Diplococcus pneumoniae, como se ilustra en la siguiente tabla. En la

320142

29



1 tabla, la actividad se expresa como el valor de CD_{50} en mg/kg; la designación a.o. indica administración oral y s.c. indica administración subcutánea.

5

Penicilina	Staph. aureus Smith		Diploc. pneum.
	a.o.	s.c.	a.o.
V	0,2	0,1	5,0
Ejemplo 1	0,05	0,03	1,2
Ejemplo 2	0,02	0,05	3,2

EJEMPLO 4

10 Producción de m- y p-fluorfenoximetilpenicilinas por fermentación con precursor y Penicillium chrysogenum

Se añaden 5 ml de agua desionizada estéril a una preparación inclinada en tubo de ensayo de Penicillium chrysogenum (variedad PC3A). Se suspenden las esporas y se utilizan 2 ml de suspensión densa para
15 inocular cada matraz con el medio de siembra. Los matraces inoculados se sacuden en una placa vibratoria giratoria (2 pulgadas de recorrido) (5 cm), durante 48 horas, a 26 °C. Cada matraz de fermentación se inocula con 4 ml de una siembra de 48 horas y se sacude en la placa vibratoria rotatoria (2 pulgadas de recorrido) (5 cm) a 26 °C.

20 Medio de siembra

Caldo corn steep (aproximadamente 50 % de sólidos)	7,0 % vol./vol.
Azúcar moreno	2,0 % peso/vol.
Yeso	1,0 % peso/vol.
Aceite de maíz	0,25 % vol./vol.

25 pH antes de la esterilización 5,8 - 6,0

320142 29



1 100 ml de medio en cada matraz cónico plano de 500 ml, cerrados con tapón de algodón.

Medio de fermentación

5 Pharmamedia (Traders Protein Division de Traders Oil Mill Co., Fort Worth 1, Texas, U.S.A.) 4 % peso/vol.

Lactosa 7,5 % peso/vol.

Yeso 1,0 % peso/vol.

Sulfato cálcico 0,5 % peso/vol.

Sulfato sódico 0,4 % peso/vol.

10 Aceite de cacahuet crudo 0,25 % vol./vol.

pH antes de la esterilización: sin ajustar

100 ml de medio en cada matraz cónico de 500 ml

con tres perlas de vidrio como difusores. Los

matraces se cierran con tapón de gasa y algodón

15 en rama. (Rellenos Martindale)

Los ácidos m- y p-fluorfenoxiacético que se utilizan como precursores

se preparan en forma de soluciones acuosas al 5 %, a pH 7 (% en peso de

ácido libre/volumen) y se esterilizan en autoclave. Se añade 1 ml de so

lución de precursor a cada matraz de fermentación al cabo de 24, 48,

20 72, 96, 120 y 144 horas después de la inoculación.

Los rendimientos en penicilina obtenidos en la anterior fermenta

ción se miden por los métodos siguientes. Se toman muestras de las fer

mentaciones a los 5 y 6 días, se separa el micelio por centrifugación y

se determina la proporción de núcleo total de penicilina en el líquido

25 que sobrenada por el método de la hidroxilamina, después de la adecuada

320142

29



1 dilución. Los resultados se expresan en forma de lecturas en el colorí
metro EEL (es decir, unidades EEL). El contenido en ácido 6-aminopeni-
cilánico (6-APA) de las muestras se determina por bio-ensayo después
de separarlo de las penicilinas por cromatografía de papel. El líquido
5 que sobrenada que se va a ensayar se diluye en agua en la proporción
1/10 y se coloca sobre los cromatogramas de papel cuádruplicados. Tam-
bién se colocan sobre los cromatogramas de papel las soluciones patrón
de ácido 6-aminopenicilánico y se desarrollan los cromatogramas con
una fase constituida por n-butanol/etanol/agua en las proporciones
10 4:1:5, se secan, se pulverizan con solución acuosa de bicarbonato só-
dico y después con cloruro de fenilacetilo en acetona para convertir
las zonas de ácido 6-aminopenicilánico de R_f 0,12 (Whatman nº 1) en
benoilpenicilina. Finalmente, se colocan los cromatogramas sobre ágar
sembrado con B. subtilis como en los bio-ensayos ordinarios y se deter-
15 mina la proporción de ácido 6-aminopenicilánico en mg/ml a partir de
los patrones. Una solución pura de ácido 6-aminopenicilánico se deter-
mina por el método de la hidroxilamina para obtener las unidades EEL/mg
que después son utilizadas para expresar los contenidos en ácido 6-ami-
nopenicilánico en unidades EEL. Finalmente, se obtienen los rendimien-
20 tos, en mg/ml, de penicilina libre en las muestras de la fermentación
con la siguiente fórmula:

Unidades EEL de núcleo de penicilina total - unidades EEL de 6-APA libre

Unidades EEL/mg de un patrón puro de bencilpenicilina sódica

25 Los resultados se expresan en bencilpenicilina sódica, sin co-
rrección de peso molecular, porque en el momento del experimento no se

320142



1 disponia de preparaciones puras de las fluorfenoximetilpenicilinas.

La formación, durante la fermentación, de una nueva penicilina se demuestra por cromatografía de papel utilizando papel Whatman nº 1, tamponado a pH 6,2, y éter saturado con agua como sistema disolvente.

5 Las posiciones de las zonas de penicilina se localizan poniendo en contacto los cromatogramas con ágar sembrado con B. subtilis.

Los resultados de estos experimentos se resumen en la tabla siguiente:

	Rendimiento en mg/ml de		Penicilina formada - zonas en el cromatograma con éter	
	Acido precursor (adición 0,05 %/día)	penicilina en la fermentación, al cabo de		
	5 días	6 días		
10	ácido m-fluorfenoxi acético	2,3	3,2	m-fluorfenoximetilpenicilina - nueva zona de 26 mm de diámetro con una migración de 16 cm
15	ácido p-fluorfenoxi acético	3,0	4,1	p-fluorfenoximetilpenicilina - nueva zona de 27 mm de diámetro con una migración de 15 cm
20	Sin precursor	2,4	1,9	"Penicilinas naturales", por ejemplo, metil, pentil, heptilpenicilinas

25 En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

320142

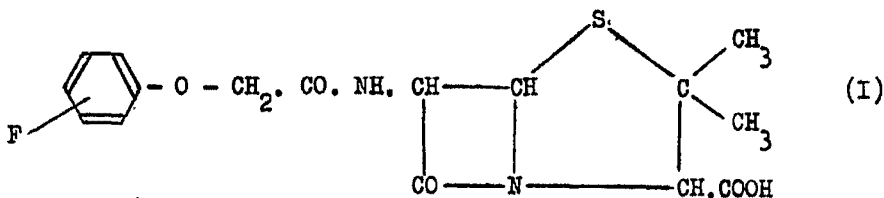


1

REIVINDICACIONES

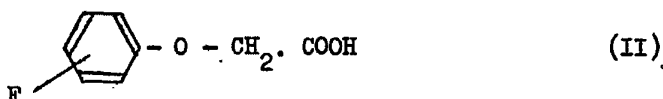
1. Un procedimiento para la preparación de penicilinas de fórmula general:

5



y sales no tóxicas de las mismas, caracterizado por combinar el ácido 6-aminopenicilánico o una sal del mismo con un ácido de fórmula general:

10



o por cultivar un moho productor de penicilina en presencia de dicho ácido o de una sal, éster, amida o amida sustituida del mismo o de un compuesto capaz de convertirse en dicho ácido.

15

2. Un procedimiento como el de la Reivindicación 1 caracterizado además por efectuar la combinación del ácido 6-aminopenicilánico y el ácido (II) mediante el empleo del cloruro de ácido de dicho ácido (II), o de un equivalente funcional del mismo, como agente acilante del grupo amino primario.

20

3. Un procedimiento como el de la Reivindicación 2 caracterizado además por ser el equivalente del cloruro de ácido los correspondientes bromuro de ácido, azida, anhídrido de ácido o anhídrido mixto con otros ácidos carboxílicos.

25

4. Un procedimiento como el de la Reivindicación 1 caracteriza



1 do además por hacer reaccionar el ácido 6-aminopenicilánico con un com
puesto intermedio formado a partir del ácido (II) y un agente de con -
densación.

5 5. Un procedimiento como el de la Reivindicación 4 caracteriza
do además por ser el agente de condensación dicitclohexilcarbodi-imida
o carbonildi-imidazol.

10 6. Un procedimiento para la preparación de las penicilinas y
sales no tóxicas de las mismas como el de la Reivindicación 1 caracte-
rizado además por preparar la m-fluorfenoximetilpenicilina haciendo re
accionar el ácido 6-aminopenicilánico con cloruro de m-fluorfenoxiace-
tilo.

15 7. Un procedimiento para la preparación de las penicilinas y
sales no tóxicas de las mismas como el de la Reivindicación 1 caracte-
rizado además por preparar la p-fluorfenoximetilpenicilina haciendo re
accionar el ácido 6-aminopenicilánico con cloruro de p-fluorfenoxiace-
tilo.

20 8. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de re-
caer la Patente de Invención que se solicita: "UN PROCEDIMIENTO PARA
LA PREPARACION DE PENICILINAS".

20

25

320142

29



1

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de doce páginas mecanografiadas.

Madrid, 29 de Noviembre de 1965

ALFONSO UNGRIA

P.P.

(Juan Pedraza)

5

10

15

20

25