



335036

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

a favor de:

FARBWERKE HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, vormals Meister Lucius & Brüning,
de nacionalidad alemana, residente en Frankfurt (M) - Hoechst (República
Federal Alemana), por:

"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE PENICILINAS"

Memoria descriptiva

5 Desde que se ha comprobado que la adición de ácido fenilacético, como
llamada sustancia precursora, a una solución de cultivo con *Penicillium*
chrysogenum favorece particularmente la formación de una determinada pe-
nicilina - la penicilina G - se realizaron distintos ensayos para obtener,
mediante la adición de distintas sustancias precursoras, penicilinas de
propiedades distintas de las conocidas.

10 En primer lugar, Behrens y colaboradores (J. Biol. Chem. 175, 751,
765, 771, 793 (1948); J. Amer. Chem. Soc. 70, 2837, 2843, 2849 (1948)
ensayaron distintas sustancias precursoras; las sales de algunas nuevas
penicilinas (por ejemplo fenoximetil-penicilina, fenil-mercapto-metil-
penicilina y otras) constituyen el objeto de las Patentes estadounidenses
2.479.295, 2.479.296, 2.479.297, 2.562.408, 2.562.410, 2.623.876 y 2.562.411,



T. 1357

así como de la patente británica 643.514.

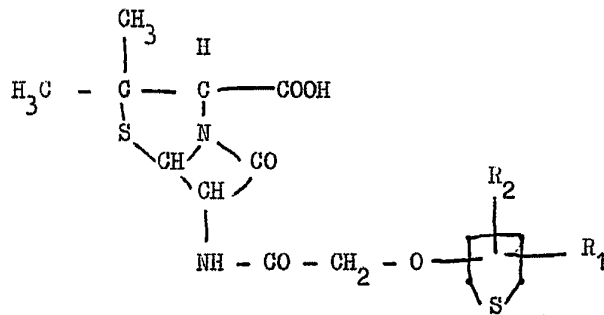
Además de los hallazgos de Behrens y colaboradores, Brandl y Margreiter
 15 (Osterr. Chemiker-Zeitung, tomo 55, 1954/11) hicieron la comprobación de que
 la fenoxi-metil-penicilina (llamada por ellos penicilina V) puede ser cris-
 talizada como ácido libre y revela una gran estabilidad a los ácidos. Por
 consiguiente, es muy adecuada para aplicaciones orales (véase Wiener Med.
 20 Wochenschrift 103, (1953), pág. 602, y las Memorias de las Patentes austria-
 cas 178.692 y 181.689).

Otra penicilina muy estable a los ácidos, la p-cresoximetilpenicilina,
 puede ser obtenida por adición de ácido p-cresoxiacético (Patente estado-
 unidense 2.756.226).

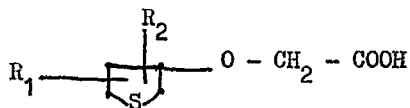
Según la Patente inglesa 916.488 se obtiene, con ácido 4-fluoro-fenilmer-
 25 captoacético como precursor, una 4-fluorofenilmercaptometilpenicilina parti-
 cularmente activa contra los microorganismos gram-negativos.

Según la publicación de la patente alemana 1.207.046 así como la Patente
 belga 650.488, es posible obtener por fermentación alquil-mercapto-fenoxi-
 metilpenicilinas.

30 Ahora bien, se ha comprobado que pueden obtenerse tieniloximetilpenici-
 linas de la fórmula general I



- donde R₁ y R₂ representan hidrógeno o un grupo metílico - y sus sales aña-
 diéndole a una solución de cultivo sembrada con un hongo formador de penici-
 45 lina, al empezar la fermentación o en el transcurso de la fermentación, en
 porciones o de manera continua, ácidos tieniloxiacéticos hasta aquí no cono-
 cidos como precursores, de la fórmula general II





1967

50 - donde R_1 y R_2 tienen el significado anteriormente indicado - o sus sales, los correspondientes aldehidos o alcoholes y respectivamente los derivados funcionales de estos compuestos, y aislando las correspondientes penicilinas en la solución de fermentación.

55 Como precursores utilizables según la invención son de considerar, por ejemplo, los siguientes ácidos tieniloxiacéticos:

55 Acido 2-tieniloxiacético, ácido 3-tieniloxiacético, ácido 5-metil-2-tieniloxiacético, ácido 3,5-dimetil-2-tieniloxiacético, ácido 2-metil-3-tieniloxiacético, ácido 3-metil-4-tieniloxiacético, ácido 2-metil-4-tieniloxiacético, ácido 2,5-dimetil-3-tieniloxiacético, ácido 2,3-dimetil-4-tieniloxiacético.

60 Los ácidos tieniloxiacéticos pueden ser obtenidos por procedimientos conocidos, por ejemplo por transformación de hidroxitiofenos con correspondientes ésteres de ácido graso alfa-halogenado y subsiguiente saponificación.

65 La adición del precursor tiene que ser regulada ventajosamente de modo que el valor pH de la solución de cultivo sea mantenida durante la fermentación entre 5,5 y 8,0, y preferiblemente entre 6,0 y 6,6.

70 El aislamiento de la correspondiente penicilina se verifica de manera en sí conocida, previa interrupción de la fermentación, por extracción de la solución de cultivo filtrada. El filtrado del cultivo es extraído -previa acidificación sobre un valor de pH de aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 2,5 - con un disolvente orgánico no susceptible de mezcla con agua, como por ejemplo acetato de etilo, cloroformo y preferiblemente acetato de butilo. A partir de éste se pasa luego la penicilina a una solución-tampón aproximadamente neutra o débilmente alcalina, preferiblemente un tampón de fosfato, de un valor pH de aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 75 8,5, y preferiblemente un valor pH de 7,0 hasta 7,5, y se vuelve a extraer en ésta, previa acidificación con un disolvente orgánico no susceptible de mezcla con agua, como por ejemplo acetato de etilo, cloroformo y preferiblemente acetato de butilo, con un valor pH de aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 80 2,5.

Se ha comprobado, además, que - en contraposición al aislamiento de, por ejemplo, penicilina V - las penicilinas de la fórmula general I pueden ser separadas de manera sencilla y económica (lo que no deja de ser sorpren-



1967

85 dente) de las sustancias precursoras arrastradas en la extracción y no consumidas si se realiza la precipitación de las penicilinas en el disolvente orgánico, y preferiblemente en acetato de butilo, por precipitación fraccionada con una sal en forma sólida, o preferiblemente en forma disuelta, de un ácido carboxílico alifático con 1-20 átomos de carbono. Como ácidos carboxílicos alifáticos son de considerar, preferiblemente, los ácidos grasos
90 con 1-9 átomos de carbono, pero también los ácidos grasos superiores, como por ejemplo el ácido palmítico, el ácido oleico, el ácido esteárico, o también ácidos dicarboxílicos, como por ejemplo el ácido oxálico y el ácido malónico; como disolventes de la sal del ácido carboxílico mencionense especialmente los alcoholes alifáticos inferiores o cetonas con 1-5 átomos
95 de carbono, y preferiblemente el metanol o la acetona. Como sales de los ácidos carboxílicos alifáticos, pueden emplearse las sales alcalinas, alcalinotérreas y amónicas, o sales con bases nitrogenadas, pero especialmente las sales alcalinas y especialmente las sales potásicas, como por ejemplo el acetato de potasio, la sal potásica del ácido etilhexanocarboxílico o la sal potásica del ácido dietilacético.
100

Sorprendentemente, al realizarse en porciones la adición de la sal de ácido carboxílico como agente de precipitación, la precipitación del precursor se verifica ya en las primeras fracciones. En las otras fracciones se precipita la penicilina, siendo muy neta la separación.

105 No era de esperar que la penicilina y el precursor pudieran ser separados de este modo porque, como muestran los ejemplos de realización 10 y 11, la penicilina V no puede ser separada, por el procedimiento anteriormente descrito, del ácido fenoxiacético, corriente como precursor. Como se indica por ejemplo en la Patente de la República Popular Alemana n^o
110 26.023, es por tanto necesario, en el caso de la penicilina V, incluso con los procedimientos más convenientes desde el punto de vista económico, realizar la separación con empleo de disolventes orgánicos. Otros procedimientos que allí también se indican implican un empleo de medidas todavía más complicadas, o mayores pérdidas. Por el contrario, por el procedimiento
115 utilizable ventajosamente según la invención, pueden obtenerse de manera sencilla sales puras, y preferiblemente las sales potásicas de las tienil oximetil-penicilinas, con las cuales, por simple disolución en agua y precipitación del ácido libre obtenible en forma de cristales, se obtienen



1967

de manera extremadamente económica penicilinas altamente purificadas.

120 Las penicilinas obtenidas según la invención en la forma de sus sales
o en la forma de ácidos libres son productos sólidos que cristalizan bien
en la mayoría de los casos. Los ácidos libres son difícilmente solubles
en agua, pero fácilmente solubles en la mayoría de los disolventes or-
125 gánicos. Según la base empleada, las sales poseen muy distintas solubili-
dades en agua; las difícilmente solubles son adecuadas para la obtención
de preparados de actividad prolongada. La estabilidad a los ácidos de
las penicilinas obtenibles según la invención permite también su empleo
terapéutico oral. Poseen una excelente actividad antibacteriana, particu-
larmente marcada contra los gérmenes gram-positivos. Los compuestos des-
130 critos en los Ejemplos poseen todos una ancha banda C=O que se encuentra
aproximadamente a 1760-1785 K, que se hace corresponder al anillo de beta-
lactama (véase L.J. Bellamy, JR-Spectra of Complex Molecules, Londres y
Nueva York, 1962, página 214).

Ejemplo 1

135 Se inoculó con esporas de *Penicillium chrysogenum* una solución esté-
ril de fase preliminar (composición : 2,0 g de azúcar de caña, 7,0 g de
licor de maíz macerado, (Cornsteep-Liquor), 1,0 g de aceites grasos y 1,0 g
de carbonato de calcio en 100 ml de agua) y se agitó durante 26 horas a
25°C. Con 1 litro de esta solución de cultivo, se inoculó la fase principal
140 de fermentación (solución estéril nutritiva : 6,45 kgs. de licor de maíz
macerado, 2,28 kgs. de lactosa, 0,75 kgs. de CaCO_3 , 0,45 kgs. de fosfato
de K primario, 40 g de MgSO_4 y 340 ml de aceites grasos en 60 litros de agua),
que se hizo fermentar a 25°C. con intensa agitación e introducción de aire
esteril. A partir de la 38ª hora, se añadieron como precursor a intervalos de
145 6 horas, en 16 dosis individuales, 22,5 g cada vez de sal de K del ácido
3-tienil-oxi-acético, disueltos en 300 ml de agua.

Después de 164 horas de duración de la fermentación, se hallan 3980
unidades de penicilina por ml. El volumen es, entonces, de 58 litros de so-
lución de cultivo, que se purifican por filtración de micelio. Se lava ul-
150 teriormente el micelio con 44 l. de agua. Del filtrado se extrae la 3-tie-
nil-oximetil-penicilina, de un pH 2, con 20 litros de acetato de butilo,
y de la fase orgánica se pasa a una solución-tampón de fosfato-bicarbonato
de Na-K, de pH 9,0, regulándose un valor pH de 7,0. De ésta se vuelve a



CT. 1967

155 extraer la penicilina mediante adición de 2,5 litros de acetato de butilo, de un pH 2, y se seca la solución de acetato de butilo separada con 250 g de sulfato sódico anhidro.

160 La separación de la penicilina del precursor presente simultáneamente en la solución de acetato de butilo se verifica por precipitación fraccionada de las sales potásicas, que cristalizan al añadirse una solución al 20% de acetato de potasio anhidro en metanol.

El aislamiento se verifica mediante filtración por aspiración, lavado con poca acetona y secado de 10 horas en vacío (2-5 mm Hg), y a temperatura ambiente. La sal potásica de la 3-tieniloximetil-penicilina contiene todavía, en estas condiciones, agua de cristalización.

165	Fración nº	Solución de acetato de K añadida	Rendimiento	Contenido
	1	125 ml	69,0 g	< 20 u/mg
	2	125 ml	48,0 g	< 20 u/mg
	3	150 ml	51,3 g	< 20 u/mg
170	4	150 ml	91,2 g	1260 u/mg
	5	150 ml	22,1 g	1250 u/mg
	6	170 ml	sin precipitación	—

175 Así, sólo a través de las fracciones 4 y 5, se aíslan en total 143,6 millones de unidades, o el 61,7% de la penicilina hallada en la solución de cultivo. De la lejía-madre, pueden separarse otros 9,7 millones de unidades (= 4,2%) de la misma manera y empleando menores volúmenes, de modo que el rendimiento total es del 65,9%.

180 Las fracciones 1 - 3 contienen prácticamente precursor puro (ácido 3-tienil-oxi-acético) como sal de potasio, con un rendimiento total de 168,3 g o 37,7% del precursor empleado para la fermentación, que pueden ser empleados para la fermentación siguiente sin ulterior purificación.

La sal potásica de la 3-tienil-oxi-metil-penicilina cristaliza en acetato de butilo en agujas incoloras, entrelazadas a menudo en haces que funden a 208-212°C. aproximadamente, con espumación y descomposición.

185 Espectro a los rayos infrarrojos : la banda estrecha y muy intensa a 1783 K, medida en el comprimido de KBr, corresponde al anillo de beta-lactama.



1967

Bandas más intensas, que faltan en el espectro IR de las sales de potasio de penicilina V y penicilina G y que distinguen de éstas la penicilina de nueva obtención, se encuentran a 1542, 1443, 1399, 1263, 1158, 1138, 861 y 838 K.

190

Espectro a los rayos ultravioleta: banda estrecha de mediana intensidad a 237 m μ y con un minimum plano a 245 m μ aproximadamente.

195

Determinaciones de la actividad: se indica con el nombre de unidad aquella cantidad de la nueva penicilina que equivale químicamente a 0,6 mg de penicilina G-sódica. El ensayo biológico (contra el *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P) produce con la sal potásica que contiene agua de cristalización de la 3-tienil-oxi-metil-penicilina aproximadamente 1260 u/mg; por el contrario, la sal de K pura y anhidra contiene 1515 u/mg.

200

Estabilidad a los ácidos: después de 1 hora a un pH 2 en tampón de HCl-glicocola y a 20°C., la actividad biológica todavía presente es del 96% aproximadamente de la sal potásica empleada.

205

Solubilidad: fácilmente soluble en agua; moderadamente soluble en metanol; difícilmente soluble en alcoholes con 2 y más átomos de C, éter, acetona, etil- y butilacetato, benceno, alcanos e hidrocarburos clorados.

Ejemplo 2

210

La fermentación se verificó de la misma manera que en el Ejemplo 1, pero, a partir de la 41ª hora, se añadieron como precursor a intervalos de 6 horas en 16 dosis individuales cada vez 11,25 g de la sal de K del ácido 3-tieniloxiacético, disueltos en 300 ml de agua.

215

Después de una fermentación de 143 horas de duración, se hallaron 3050 u/ml y el volumen de la solución de cultivo era de 64 l.

Previa filtración y lavado con 46 l. de agua, se obtuvo según el Ejemplo 1 una solución de acetato de butilo secada con sulfato sódico anhidro. La precipitación fraccionada con solución metanólica de acetato potásico condujo, previa filtración por aspiración y lavado con un poco de acetona, a la obtención de productos cristalizados que se secaron durante 5 horas, a 40°C., en el vacío (2 - 5 mm. Hg).



Fracción n ^o	Solución de acetato de K añadida	Rendimiento	Contenido	
220	1	50 ml	31,3 g	< 20 u/mg
	2	50 ml	18,3 g	< 20 u/mg
	3	100 ml	39,3 g	< 20 u/mg
	4	100 ml	80,0 g	1394 u/mg
	5	100 ml	sin precipitación	—

225 La fracción 4 contiene, por tanto, 111,5 millones de unidades o un 57,2% de la penicilina en la solución de cultivo fermentada. Pudo aislarse más penicilina en cantidad mínima de la lejía madre de acetato de butilo.

Las fracciones 1 - 3 contienen con un rendimiento del 43,2% precursor que pudo ser empleado directamente para la ulterior fermentación.

230 Ejemplo 3

Una solución de fase preliminar estéril (composición : 2,0 g de azúcar de caña, 7,0 g de licor de maíz macerado, 1,0 g de aceites grasos, 1,0 g de carbonato de calcio en 100 ml de H₂O) se inoculó con esporas de *Penicillium chrysogenum* y se agitó durante 26 horas a 25°C. Con esta solución de cultivo se inoculó un fermentador preliminar (solución estéril de cultivo: 7,4 kg de azúcar de caña, 28 kg. de licor de maíz macerado, 3,7 g de carbonato de Ca, 3,7 litros de aceites grasos, 370 litros de agua) y se hicieron fermentar durante 36 horas a 25°C., agitando intensamente y aireando. A continuación se pasó la solución a la fase principal de fermentación (solución estéril de cultivo: 170 kg. de lactosa, 106,5 kg. de maíz macerado seco, 12,75 kg. de carbonato de Ca, 17,7 kg. de fosfato de K primario, 4,94 kg. de sulfato de Mg, 6,25 litros de aceites grasos, completados con agua hasta 2.500 litros), que se hizo fermentar a 25°C. con intensa agitación y aireación. A partir de la 71ª hora, se añadieron en 20 adiciones individuales, cada 3 horas, cada vez 192,5 g de sal de K del ácido 3-tieniloxiacético, disueltos en 5 litros de agua, como precursor.

240 Después de 147 horas de duración de la fermentación, se hallaron 2200 u/ml. El volumen era, entonces, de 2200 litros, y después de filtración y lavado ulterior de 2950 litros.

245 La ulterior preparación se verificó de acuerdo con el Ejemplo 1 y condujo a la obtención de 35 l. de una solución de acetato de butilo enriquecida



y secada con sulfato sódico anhidro.

La separación de la penicilina y del precursor se verificó por precipitación fraccionada con solución metanólica de acetato de potasio.

	Fración n ^o	Solución de acetato de K añadida	Rendimiento	Contenido
255	1	2000 ml	368,0 g	< 50 u/mg
	2	1000 ml	350,5 g	< 50 u/mg
	3	2000 ml	1045,5 g	1487 u/mg
260	4	2000 ml	676,5 g	1225 u/mg
	5	3000 ml	sin precipitación	—

Las fracciones 3 y 4 contienen, por tanto, 2380 millones de unidades, o un 49,2% de la penicilina presente en la solución de cultivo. El precursor recuperado equivale a un 34,5% del empleado, encontrándose en un estado suficientemente puro para ser empleado para la fermentación siguiente.

265

Ejemplo 4

Ensayo de separación de la penicilina V y del ácido fenoxiacético, realizado a título comparativo.

270

Como solución inicial, sirvió un filtrado de cultivo de fermentación de penicilina que contenía en un volumen de 53 l. 44,6 g de penicilina V y 46,5 g de ácido fenoxi-acético (calculados ambos como ácidos libres). El aislamiento de la penicilina V se verificó de acuerdo con el Ejemplo 1.

275

Después de cubrir con una capa de acetato de butilo, se acidificó hasta un pH de 1,95, se separó la fase orgánica y se extrajo nuevamente la capa acuosa con el mismo disolvente. Después de pasar los ácidos del acetato de butilo a una solución-tampón acuosa de un pH = 7, se volvió a acidificar la capa acuosa bajo acetato de butilo hasta un pH de 1,95 y se secó la fase orgánica, previa separación, con sulfato sódico anhidro. El volumen final era, después de la filtración y del lavado ulterior, de 4,55 l. De acuerdo con los Ejemplos 1 - 3, se efectuó luego la precipitación fraccionada por adición de una solución al 20% de acetato de potasio anhidro en metanol:

280



OCT. 1967

	Fración nº	Solución de acetato de K añadida	Rendimiento	Actividad	+)
	1	50 ml	12,0 g	58 u/mg	
285	2	50 ml	23,0 g	650 u/mg	
	3	50 ml	20,8 g	840 u/mg	
	4	50 ml	22,0 g	825 u/mg	
	5	100 ml	16,8 g	950 u/mg	
290	6	100 ml	16,0 g	< 20 u/mg	(acetato de K)

+) Determinada biológicamente en comparación con la de penicilina V (Standard de Referencia USP con 1672 u/mg).

295 Como sustancias sólidas - aunque se había recuperado así en las fracciones 1 - 5 el 92,3% de la suma de penicilina V + precursor, que contenía el 88,9% de la actividad biológica de la penicilina V demostrada inicialmente - ninguna fracción contenía, además del precursor, más de 950 u/mg, o del 62% aproximadamente, de penicilina V (la sal potásica pura de la penicilina V contiene 1529 u/mg).

Ejemplo 5

300 Ensayo de separación de penicilina V y de ácido fenoxiacético que se encuentran en solución en cantidad aproximadamente equimolar, realizado a título de comparación.

305 Sirvió como solución inicial un filtrado de cultivo de fermentación de penicilina que, en un volumen de 55 l. contenía 146,10 g., correspondientes a 0,417 mol de penicilina V, y 68,46 g de ácido fenoxiacético, correspondientes a 0,45 mol. El aislamiento se verificó de la manera indicada en el Ejemplo 4.

El volumen final de la solución secada de acetato de butilo fué de 3,74 litros.

310 Resultado de la precipitación fraccionada con una solución al 20% de acetato de potasio anhidro en metanol.



1967

	Fracción nº	Solución de acetato de K añadida	Rendimiento	Actividad +)
	1	80 ml	45,3 g	1260 u/mg
315	2	80 ml	31,7 g	870 u/mg
	3	80 ml	42,5 g	975 u/mg
	4	80 ml	39,3 g	1095 u/mg
	5	80 ml	35,1 g	890 u/mg
	6	80 ml	9,1 g	650 u/mg
320	7	80 ml	0,8 g	1310 u/mg

+) Determinada biológicamente en comparación con la de la penicilina V (Standard de Referencia USP con 1672 u/mg).

Tampoco aquí, como en el Ejemplo 4, se verificó separación alguna de penicilina V y de precursor.

325 Ejemplo 6

De una solución nutritiva estéril de composición: 20 g de azúcar de caña, 10 g de carbonato de Ca y 76 g de licor de maíz macerado, completada con agua hasta 1000 ml, se vertieron 80 ml de un matraz de Erlenmeyer de 300 ml., se inocularon con esporas de *Penicillium chrysogenum* y se sacudieron durante 48 horas a 25°C. De este cultivo, indicado con el nombre de fase preliminar, se inocularon 3 ml en 50 ml de una solución de fase principal estéril (composición 55 g de lactosa, 50 g de licor de maíz macerado, 7 g de fosfato potásico primario, 10 g de carbonato de calcio, 3 g de sulfato de magnesio, completados con agua hasta 1000 ml.) y se sacudió a 330 25°C. Después de 24 horas, se añadieron 125 mg. de ácido 3-tieniloxiacético como precursor. Después de sacudir otras 96 horas, se hallaron 1409 unidades de penicilina estable a los ácidos por ml de solución. La preparación fué realizada como se indica en el Ejemplo 1, dando los mismos resultados.

335 Ejemplo 7

340 Por el mismo procedimiento del Ejemplo 6, se obtienen con adición de 125 mg de amida de ácido 3-tieniloxiacético como precursor 1576 unidades de penicilina estable a los ácidos por ml de solución, con adición de 125 mg de sal sódica de ácido 3-tieniloxiacético como precursor, 2020 unidades de penicilina estable a los ácidos por ml de solución, con adición de 125 mg de ácido 2-metil-4-tieniloxiacético como precursor 1885 unidades de penici-



1967

lina estable a los ácidos por ml de solución, o, con adición de 125 mg de ácido 2-metil-5-tieniloxiacético como precursor, 1482 unidades de penicilina estable a los ácidos por ml de solución.

350 En un ensayo comparativo, no se añadió precursor alguno a la solución de cultivo, no formándose penicilina estable a los ácidos.

Ejemplo 8

355 Se disolvieron en 3,0 l. de agua desalada 656,6 g de sal potásica de 3-tieniloxi-metil-penicilina, que reveló en el ensayo biológico una actividad de 1515 u/mg, se filtró por aspiración con 15 g de carbón en polvo y se lavó ulteriormente el filtro con 100 ml de agua desalada.

360 Al filtrado se le añadió a gotas, lentamente y agitando bien, ácido clorhídrico 1n, y, después de presentarse el primer enturbiamiento, se inoculó con 2 g del ácido libre puro y cristalizado de 3-tieniloxi-metil-penicilina, regulándose mediante ulterior adición de ácido un valor pH de 2,0. Después de agitar ulteriormente durante 1 hora, se filtró por aspiración el precipitado, se lavó ulteriormente con 200 ml de agua desalada y se secó a 2 - 5 mm. de Hg primero 24 horas a temperatura ambiente, y luego 5 horas a 50°C. El rendimiento fué de 571,3 g, o el 91,7% de la actividad biológica de la sal potásica empleada. La actividad biológica comprobada fué de 1620 u/mg.

365 El ácido libre de la 3-tieniloxi-metil-penicilina cristaliza en agujas incoloras que, previa sinterización funden a 120°C. aproximadamente, con espumación y descomposición (color pardo).

370 Espectro a los rayos infrarrojos: Una banda ancha característica del anillo de la beta-lactama (oscilación C=O) a 1760 K demuestra la presencia de la estructura básica de la penicilina.

Determinación de la actividad: El ensayo biológico (contra el Staph. aureus ATCC 6538 P) revela 1650 u/mg.

375 La estabilidad a los ácidos corresponde a la de la sal de potasio cuando el ácido libre ha sido llevado a solución acuosa antes del examen mediante adición de álcali (tampón).

Solubilidad: Muy difícilmente soluble en agua, moderada hasta fácilmente soluble en los disolventes orgánicos corrientes.

Ejemplo 9

380 Se disolvieron 450,0 g de la sal potásica de 3-tieniloxi-metil-penicilina, de un contenido de 990 u/mg, así como 27,5 g con 1110 u/mg en



T. 1967

385 6,0 l. de agua desalada, y se filtraron por aspiración con 15 g de carbón en polvo. Luego, se añadieron 18 l. de agua desalada y se reguló lentamente y bajo agitación la solución con ácido clorhídrico in sobre un pH = 2,0. Después de producirse el primer enturbiamiento a un pH de 3,5 aproximadamente, se inoculó con 2,0 g del ácido libre puro de la penicilina. Después de agitar durante 1 hora, se filtró por aspiración, se lavó con un poco de agua y se secó el residuo de filtración a 2 - 5 mm. de Hg., primero durante 10 horas a temperatura ambiente y luego 4 horas a 40°C. El rendimiento de ácido libre de la 3-tieniloxi-metil-penicilina fué de 249,0 g y la actividad biológica de 1650 u/mg.

390

Ejemplo 10

395 Se disolvieron en 250 ml de agua desalada 30 g de la sal potásica de 3-tieniloxi-metil-penicilina, de una actividad biológica de 1394 u/mg. Luego, se añadió lentamente a gotas una solución de 32,4 g de diacetato de N,N'-dibencil-etileno-diamina en 250 ml de agua desalada. Después de presentarse el primer enturbiamiento, se inoculó con una pequeña cantidad de la sal cristalizada, se continuó la adición a gotas y se añadió ulteriormente 1,0 l. de agua desalada. Después de agitar ulteriormente durante 30 minutos, se filtró por aspiración, se lavó ulteriormente con 100 ml de agua y se secó durante 12 horas a temperatura ambiente y a 2 - 5 mm. de Hg. Rendimiento de sal 33,0 g.

400

La sal cristaliza en agujitas incoloras que funden con descomposición a 135 - 140°C.

405 Espectro a los rayos IR : una ancha banda, característica del anillo de beta-lactama a 1773 K, demuestra la estructura básica de la penicilina.

Actividad: el ensayo biológico revela una actividad de 1274 u/mg.

La solubilidad en agua de la sal a temperatura ambiente es de 0,5 g. aproximadamente por litro.

Ejemplo 11

410 Se disuelven en 400 ml de acetato de n-butilo 10,0 g de 3-tieniloxi-metil-penicilina en forma de ácido libre y se añaden 4,11 g de N-etil-piperidina. Previa inoculación, la N-etil-piperidina de la 3-tieniloxi-metil-penicilina se separó por cristalización. Después de una corta agitación, se filtró por aspiración, se lavó ulteriormente con 30 ml de acetato de butilo puro y se secó durante 12 horas a temperatura ambiente, y 4 horas

415



T. 1967

a 50°C. a 1 - 5 mm. de Hg.

El rendimiento fué de 12,0 g de una sal incolora y cristalina que funde con descomposición a 126 - 128°C. Se disuelve muy bien en agua.

El ensayo biológico reveló una actividad de 1180 u/mg.

420

El espectro a los rayos IR revela la banda de beta-lactama a 1770-1775 K.

Ejemplo 12

Se disolvieron en 100 ml de agua 10 g de sal potásica de la 3-tieniloxi-metil-penicilina y se añadieron 8,96 g de clorhidrato de procaína en 25 ml de agua. Previa inoculación, la sal de procaína de la 3-tieniloxi-metil-penicilina cristalizó en agujas incoloras y prismáticas, entrelazadas a menudo en grandes mechones. Previa aspiración, se lavó ulteriormente con un poco de agua y se secó a 1 - 5 mm de Hg, primero durante 15 horas a temperatura ambiente, y luego 4 horas a 50°C.

425

El rendimiento fué de 13,5 g; la sal se funde con descomposición a 97 - 100°C. aproximadamente. Es difícilmente soluble en agua y, por el contrario, bien soluble en etanol.

430

El ensayo biológico reveló 995 u/mg.

El espectro a los rayos IR revela la ancha banda de la beta-lactama a 1775 K aproximadamente.

435

Ejemplo 13

Se adicionaron 10 g de sal potásica de la 3-tieniloxi-metil-penicilina en 100 ml de agua con 8,08 g de clorhidrato de amina de 3,3'-difetilpropeno-(2) en 300 ml de agua.

440

Después de frotar con agua, la sal precipitada, oleosa inicialmente, se puso cristalina. Se filtró por aspiración y se secó durante 36 horas, en vacío y a temperatura ambiente.

El rendimiento fué de 12,85 g, que fundían a 128°C. aproximadamente con descomposición. La sal no es soluble en agua, pero es bien soluble en metanol.

445

El ensayo biológico reveló 1170 u/mg.

El espectro a los rayos IR revela una ancha banda de C=O (beta-lactama) a 1775 K.

Ejemplo 14

Se disolvieron 10 g de ácido libre de la 3-tieniloxi-metil-penicilina en 330 ml de acetato de butilo saturado de agua, se añadieron 40 g de sul-

450



1967

455 fato sódico anhidro, se filtraron por aspiración y se lavaron ulteriormente con 20 ml de acetato de n-butilo. Luego se añadieron a gotas, agitando, 7,17 g de dibencilamina. La sal que se había separado por cristalización fué filtrada por aspiración después de agitar 30 minutos, se lavó con un poco de acetato de butilo y se secó en vacío a temperatura ambiente.

El rendimiento fué de 14,5 g de una sal cristalina incolora que funde con descomposición a 86 - 87°C. Es difícilmente soluble en agua, pero bien soluble en metanol.

El ensayo biológico reveló 1080 u/mg.

460 El efecto a los rayos infrarrojos revela una ancha banda de C=O (beta-lactama) a 1775 K aproximadamente.

Ejemplo 15

465 Se disolvieron de acuerdo con el Ejemplo 14, 10 g de ácido libre de la 3-tieniloxi-metil-penicilina en acetato de n-butilo y se adicionaron con 2,14 g de n-propilamina-(1). El precipitado oleoso, turbio inicialmente, cristalizó previa inoculación y agitación. Después de 30 minutos, se filtró por aspiración, se lavó ulteriormente con poco acetato de butilo y se secó en vacío a temperatura ambiente.

470 El rendimiento de sal incolora fué de 10,8 g, que funden con descomposición a 82 - 85°C. aproximadamente. Se disuelve bien en agua. El ensayo biológico reveló 1240 u/mg.

El espectro a los rayos infrarrojos revela una ancha banda de C=O (beta-lactama) a 1780 K.

475 Esta solicitud corresponde a la presentada en Alemania el 31 de Diciembre de 1.965 bajo el número F 48 063 IVa/30h, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto de la Propiedad Industrial y del artículo 4º del Convenio de la Unión.

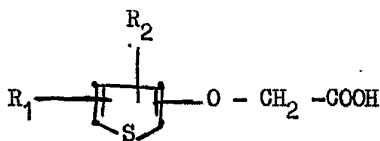
REIVINDICACIONES

480 1). Procedimiento para la obtención de tieniloximetil-penicilinas y de sus sales, caracterizado por añadirse a una solución de cultivo inoculada con un hongo productor de penicilina, a modo de precursor, al empezar la fermentación o en el transcurso de la fermentación, en porciones o de manera continua, ácidos tieniloxiacéticos de la fórmula general



1. 1967

485



490

- donde R_1 y R_2 representan hidrógeno o un grupo metilo - y respectivamente sus sales, alcoholes o aldehidos correspondientes o derivados funcionales de estos compuestos, y aislarse de la solución de fermentación las correspondientes penicilinas.

495

2). Procedimiento según la reivindicación 1), caracterizado por verificarse el aislamiento por precipitación fraccionada con una sal de un ácido carboxílico alifático con 1 - 20 átomos de carbono en el medio de extracción, pudiéndose emplear las sales en forma sólida o preferiblemente disueltas en un alcohol alifático inferior o cetona.

3). "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE PENICILINAS".

Esta Memoria consta de dieciseis hojas foliadas y mecanografiadas por un sólo lado de sus caras.

Madrid, 28 de Diciembre de 1966