

340130



340130

MEMORIA DESCRIPTIVA de Patente de In-
vención que, por veinte años en España y posesiones, soli-
cita la firma ANKERFARM, S.p.A., establecida en Cinisello
Bálsamo (Milán), Viale Lombardia, 5, por: "PROCEDIMIENTO
PARA LA PRODUCCION DE PENICILINAS SEMISINTÉTICAS".

Inventores: D. Bonfanti Giovanni - Via Magenta, 180- Ses-
to S.Giovanni - Milán.
D. Caputo Ezio - Via Próspero Finzi, 15-MILAN
D. Zannini Enzo - Via Constanza, 9 - Milán.

===oooOooo===

Este invento se refiere a la producción de penicili-
nas semisintéticas por un procedimiento rápido y barato.

Dicho método consiste en la reacción química entre -
cloruros ácidos y ácido 6-aminopenicilánico, absorbido en
5 resinas de amonio. Hemos obtenido ácido 6-aminopenicilá-
nico por vía biológica, utilizando microorganismos produc



340130

tores de complejos enzimáticos que pueden dividir las penicilinas en ácido 6-aminopenicilánico y en radical ácido.

10 La característica más importante de éste invento es que el ácido 6-aminopenicilánico contenido en un caldo de enzimación es absorbido selectivamente en resinas aniónicas y reacciona directamente con los necesarios cloruros ácidos para obtener las penicilinas deseadas.

15 Por medio de dicho método es posible obtener la penicilina, evitando fases de trabajo intermedias que son necesarias en los demás métodos conocidos.

Nuestro método proporciona muchas ventajas, además de que es rápido, sencillo y de aplicación barata, que pueden relacionarse como sigue:

- 20 - Separación cuantitativa del ácido 6-aminopenicilánico de los caldos de enzimación, evitando así las pérdidas debidas a la degradación del ácido 6-aminopenicilánico durante las fases de levigación y concentración.
- 25 - Posibilidades de obtener concentraciones relativamente muy altas de ácido 6-aminopenicilánico suspendiendo las resinas absorbentes en la más pequeña cantidad de agua. Esto favorece la reacción y las siguientes fases de recuperación.
- 30 - Absorción del ácido 6-aminopenicilánico en las resinas, eliminando así la mayoría de las substancias proteicas contenidas en los caldos de enzimación que podrían interferir la reacción. Así, es posible obtener productos finales casi puros, sin tener que recurrir a la cristalización.

35 El nuevo método está basado en el hecho de que el gru

340130



-3-

po -COOH del ácido 6-aminopenicilánico se eslabona a la re
sina básica, dejando así libre al grupo -NH₂ del mismo áci
do 6-aminopenicilánico, el cual reacciona con el cloruro
ácido.

40 Al final de la reacción tiene lugar una cadena en el,
potencial de intercambio, y por lo tanto, la penicilina ob
tenida es desprovista de la resina pasando a la solución
acuosa.

45 También hemos observado que la adición de NaCl a los
caldos de reacción, además de eliminar parcialmente la hi-
drolisis del cloruro ácido, favorece al final de la reac-
ción el desprendimiento completo de las penicilinas de la
resina, dando rendimientos de reacción casi cuantitativos.

50 Por medio de nuestro método también es posible, utili
zando resinas aniónicas, obtener las deseadas penicilinas
semisintéticas con caldos de enzimación conteniendo canti-
dades mínimas de ácido 6-aminopenicilánico.

55 Es bien sabido que, para una recuperación conveniente
del ácido 6-aminopenicilánico, su contenido en el caldo de
be encontrarse por encima del producto de solubilidad en
el mismo.

Esto puede obtenerse de dos formas:

- 60
- 1) Por concentración de la cantidad del enzima producido
por los microorganismos, de forma que se obtenga mucho
complejo enzimático, que pueda dividir altas cantida-
des de penicilina en ácido 6-aminopenicilánico.
 - 2) Utilizando caldos de cultivo que puedan convertir pe-
queñas cantidades de penicilina en ácido 6-aminopeni-
cilánico, y sucesivamente concentrando la solución con



301-4-

340130

65 teniendo ácido 6-aminopenicilánico.

Estos métodos suponen muchos inconvenientes debido a las pérdidas que se experimentan durante las diferentes fases de trabajo.

70 Utilizando nuestro nuevo método es posible evitar todos los mencionados inconvenientes, ya que se evitan las diferentes fases de concentración, bien del complejo enzimático, o bien del ácido 6-aminopenicilánico después de la conversión.

75 Para éste procedimiento pueden ser utilizadas resinas de tipo aniónico, tales como Amberlite IRA-401, 401S, 402, 410, 45, 400, Naclite SBS-Sar, Dowex 50, etc. El ácido 6-aminopenicilánico contenido en el caldo de enzimación, se eslabonan dichas resinas. Entonces, las resinas son bien lavadas con agua hasta que se eliminan todos los caldos ,

80 se recogen en un reactor y se suspenden en agua destilada, a la cual se añade acetona, NaCl y NaHCO_3 . La temperatura se pone a 0°C, y siempre bajo agitación, se añade una solución de acetona en cloruro ácido. El total se sacude durante horas, y al final de la agitación, se filtran las resinas,

85 manteniendo siempre la temperatura de 0°C. El pH se ajusta a 2 con ácido mineral y el total se somete a recuperación por medio de un disolvente inmiscible con agua (éter, metilisobutilquetona, acetato de étilo, acetato de butilo, etc.). El disolvente se lava con agua desionizada

90 y se recupera con una solución al 5% de bicarbonato que después se decolora con carbón, se filtra y se liofiliza.

Los siguientes ejemplos ilustran el presente invento, sin limitar el mismo, sin embargo.



340130

Ejemplo 1.

95 Un cultivo de *E. coli* Ankerfarm sp. 27/14, hecho resistente a 10.000 y/ml. de ácido fenilacético, se hace crecer en un medio que contiene como único componente una fuente de N proteico.

100 Este cultivo se incuba a continuación a 28°C, se sacude y se airea para obtener un buen grado de crecimiento (6 a 7 mil millones de células/ml.). El caldo de cultivo bien crecido se centrifuga y la masa celular obtenida se lava y suspende en agua en una concentración de 60 mil millones de células por ml. A ésta suspensión celular se
105 añade el bacteriófago específico para el microorganismo, que dentro de 15 a 30 minutos puede lisar totalmente toda la masa celular, liberando el complejo enzimático contenido en las células. Cuando la lisis ha terminado, las células son separadas por centrifugación y el caldo limpio
110 es ajustado a pH 7 por medio de NaOH y se calienta a 37°C. Se añade al caldo una cantidad de bencilpenicilina, correspondiente al 70%; el total se sacude continuamente y se mantiene constantemente a pH entre 7,5 y 8,0 por medio de la adición de NaOH. Después de 15 a 18 horas, se obtiene
115 un rendimiento de conversión del 86% de bencilpenicilina en ácido 6-aminopenicilánico.

Con 840 ml. de éste caldo se ponen a 0°C, se acidifican con un 5% de ácido hidroclicórico hasta pH 2,8 y se recuperan con 200 ml. de éter; después de la separación de
120 las dos fases, la fase acuosa que contiene el ácido 6-aminopenicilánico se ajusta a pH 6 con un 5% de hidróxido de sodio. La solución se filtra lentamente en 200 ml. de re



340130

sina Amberlite IR A-401, regenerada con NaCl.

125 El caldo filtrado tiene un contenido de ácido 6-aminopenicilánico del 0,37%.

La resina se lava con agua desionizada para obtener una solución clara, libre de iones, en el afluente.

130 La resina se suspende en 500 ml. de agua desionizada y se la añaden 20 g. de NaCl, 30 g. de NaHCO₃ y 350 ml. de acetona. La temperatura se pone a 0°C y a la suspensión se añaden lentamente 25,5 g. de ce cloruro del ácido fenilacético, disueltos en 300 ml. de acetona. La solución se sacude durante 2 horas y después se filtra y se recupera 3 veces con 300 ml. de éter cada vez. Los caldos agotados se vacían. El éter recogido se lava dos veces con agua desionizada y se recupera dos veces con 115 ml. de una solución al 6% de bicarbonato de sodio. La solución acuosa de bicarbonato de sodio se decolora con carbón vegetal, se filtra y se liofiliza; se obtienen 47,9 g. de bencilpenicilina con una potencia del 96%, y con un rendimiento del 93%, calculado sobre el valor teórico.

135

140

Ejemplo 2.

145 Un cultivo de E. coli Ankerfarm sp. 27/14, hecho resistente a 10.000 y/ml. de ácido fenilacético, se hace crecer en un medio, conteniendo como único componente una fuente de N proteico. Dicho cultivo se incubaba a 28°C, se sacude y se airea para obtener un buen grado de crecimiento (6 a 7 mil millones de células por ml.). Al caldo se añade después bencilpenicilina en la concentración del 5%.
150 El caldo se calienta a 37°C, se ajusta su pH a 7,8 con NaOH y se mantiene bajo sacudimiento. Dentro de las 6 a 8

340130



horas se obtiene una conversión de bencilpenicilina en ácido 6-aminopenicilánico. El caldo se separa por centrifugación y los 11 litros de caldo así obtenido se ponen a 155 0°C, se acidifican con ácido hidroclicórico al 5% a pH 2,5 y se recuperan con 2,6 lts. de éter; después de la separación de las dos fases, la fase acuosa que contiene el ácido 6-aminopenicilánico se ajusta a pH 6 con un 5% de hidróxido de sodio. Esta solución se filtra lentamente en 160 200 ml. de Ambertlita IRA-401 regenerada con NaCl. El caldo filtrado tiene un contenido del 0,20% de ácido 6-aminopenicilánico. La resina se lava con agua desionizada, para obtener una solución clara, sin iones, en el afluente. La resina se suspende en 500 ml. del agua desionizada. A 165 continuación se añaden a la misma 20 g de NaCl, 30 g. de NaHCO₃ y 250 ml. de acetona. La temperatura se pone a 0°C y a la suspensión se añaden lentamente 25,5 g. de cloruro del ácido fenilacético, disueltos en 300 ml. de acetona. La solución se sacude durante dos horas y después 170 se filtra y se recupera tres veces con 300 ml. de éter cada vez.

Los caldos agotados se descargan.

El éter recogido se lava dos veces con agua desionizada y se recupera dos veces con una solución al 2% de bicarbonato de sodio. La solución acuosa de bicarbonato de sodio se decolora con carbón vegetal, se filtra y se liofiliza. 175

Se obtienen 46,5 g. de bencilpenicilina, con una potencia del 95,8%, con un rendimiento del 90,2%, calculado 180 sobre el valor teórico.

340130



957-8-

Ejemplo 3.

185 Un cultivo de *E. coli* Ankerfarm sp. 27/14, hecho resistente a 10.000 y/ml. de ácido fenilacético se hace crecer en un medio conteniendo como solo componente una fuente de N proteico. Dicho cultivo se incuba a 28°C, se sacude y se airea para obtener un buen grado de crecimiento (6 a 7 mil millones de células por ml.). El caldo de cultivo bien crecido se centrifuga y la masa celular obtenida se lava y se suspende en agua a una concentración de
190 60 mil millones de células por ml. A ésta suspensión celular se añade el bacteriófago específico del microorganismo. Dicho bacteriófago, en 15 a 30 minutos puede lisar completamente la masa celular liberando el complejo enzimático contenido en las células.

195 Al final de la lisis, las células son separadas por centrifugación y el caldo limpio obtenido se ajusta a pH 7,8 con NaOH y se calienta a 37°C. Al caldo se añade entonces bencilpenicilina en la concentración del 70%; el conjunto se sacude continuamente y se mantiene constantemente a un pH entre 7,5 y 8,0 por medio de la adición de
200 NaOH. Después de 15 a 18 horas, se obtiene una conversión del 85% de rendimiento de bencilpenicilina en ácido 6-aminopenicilánico.

205 Con 840 ml. de dicho caldo se ponen a 0°C, se acidifican con un 5% de ácido hidroclicórico a pH 2,8 y se recuperan con 200 ml. de éter. Después de la separación de las dos fases, la fase que contiene el ácido 6-aminopenicilánico se ajusta a pH 6 con un 5% de hidróxido de sodio.

Esta solución se filtra lentamente en 200 ml. de re-



340130

210 sina Amberlite IRA-401 regenerada con NaCl. El caldo fil
trado tiene un contenido de ácido 6-aminopenicilánico del
0,37%. La resina se lava con agua desionizada para obte-
ner una solución clara, libre de iones, en el afluente .
La resina se suspende en 500 ml. de agua desionizada; a
215 continuación se añaden 20 g. de NaCl, 30 g. de NaHCO₃ y
250 ml. de acetona. La suspensión se pone a 0°C y se le
añaden lentamente 25 g. de cloruro de ácido fenoxiacéti-
co, disueltos en 300 ml. de acetona.

La solución se sacude durante 2 horas, a continuación
220 se filtra y se recupera 3 veces con 300 ml. de éter cada
vez.

Los caldos agotados se descargan.

El éter recogido se lava dos veces con agua desioni-
zada y se recupera dos veces con 115 ml. de una solución
225 al 5% de bicarbonato de potasio. La solución acuosa de
bicarbonato de potasio se decolora con carbón vegetal, se
filtra y se liofiliza.

Con 54,3 g. de fenoximetilpenicilina, con una poten-
cia del 95,5%, se obtienen, con un rendimiento del 91%,
230 calculado sobre el valor teórico.

Ejemplo 4.

Un cultivo de E. coli Ankerfarm sp. 27/14, hecho re-
sistente a 10.000 y/ml. de ácido fenilacético, se hace -
crecer en un medio conteniendo como único componente una
235 fuente proteica de N.

Dicho cultivo es incubado a 28°C, sacudido y aireado
para obtener un buen grado de crecimiento (6 a 7 mil mi-
llones de células por ml.). A éste caldo se añade enton-

340130



-10-

240 ces bencilpenicilina en una concentración del 5%. A con
tinuación el caldo se calienta a 37°C, se ajusta a pH 7,8
con NaOH y se mantiene bajo sacudimiento. En 6 a 8 horas
se obtiene una conversión de un rendimiento del 90% de
bencilpenicilina en ácido 6-aminopenicilánico.

245 El caldo es separado por centrifugación; 11 lts. del
caldo limpio obtenido se ponen a 0°C, se acidifican con
un 5% de ácido hidroclicórico a pH 2,5 y se recuperan con
2,6 lts. de éter. Después de haber separado las dos fa-
ses, la fase acuosa, conteniendo ácido 6-aminopeniciláni-
co, se ajusta a pH 6 con un 5% de hidróxido sódico. La
250 solución se filtra entonces lentamente en 200 ml. de resi-
na Amberlite IRA-401, regenerada con NaCl. El caldo filtra-
do tiene entonces un contenido del 0,20 por ciento de áci-
do 6-aminopenicilánico.

255 La resina se lava con agua desionizada para obtener
una solución clara, libre de iones, en el efluente. La
resina se suspende en 500 ml. de agua desionizada. A con
tinuación se añaden 20 g. de NaCl, 30 g. de NaHCO₃, y 250
ml. de acetona.

260 La solución se pone a 0°C y se le añaden lentamente
23 g. de cloruro del ácido fenoxiacético disueltos en 300
ml. de acetona. La solución se sacude durante dos horas,
se filtra y se recupera tres veces con 300 ml. de éter ca
da vez. Los caldos agotados son descargados.

265 El éter recogido se lava dos veces con agua desioni-
zada y se recupera dos veces con 115 ml. de una solución
al 5% de bicarbonato potásico. La solución acuosa de bi
carbonato potásico se decolora con carbón vegetal, se fil

340130



111-

tra y se liofiliza.

270 Se obtienen 50 g. de fenoximetilpenicilina con una potencia del 94,8%, con un rendimiento del 98%, calculado sobre el valor teórico.

Ejemplo 5.

275 Procédase según se indica en el ejemplo 3, utilizando 30,5 g. de cloruro del ácido fenoxipropiónico en lugar del cloruro del ácido fenoxiacético.

Se obtienen 50,3 g. de feneticilina con una potencia del 96,5%, con un rendimiento del 87% calculado sobre el valor teórico.

Ejemplo 6.

280 Procédase según se indica en el ejemplo 4, usando 30,5 g. de cloruro del ácido fenoxipropiónico, en lugar del cloruro fenoxiacético.

285 Se obtienen 50,2 g. de feneticilina con una potencia del 95%, con un rendimiento del 85,5%, calculado sobre el valor teórico.

Ejemplo 7.

Procédase según se describe en el ejemplo 3, utilizando 32,7 g. de cloruro del ácido fenoxibutírico en lugar del cloruro del ácido fenoxiacético.

290 Se obtienen 54 g. de propicilina con una potencia del 96,2%, con un rendimiento del 90%, calculado sobre el valor teórico.

Ejemplo 8.

295 Procédase según se describe en el ejemplo 4, utilizando 34,7 g de cloruro del ácido fenoxibutírico en lugar de cloruro del ácido fenoxiacético.

340130



Se obtienen 52,8 g. de propicilina con una potencia del 94,5%, con un rendimiento del 86% calculado sobre el valor teórico.

300

Ejemplo 9.

Procédase según se describe en el ejemplo 1, utilizando 36,5 g. de cloruro del ácido 5-metil-3-fenil-4-isoxazólico en lugar del cloruro del ácido fenoxiacético.

305

Se obtienen 54,3 g. de oxacilina con una potencia del 97%, con un rendimiento del 86%, calculado sobre el valor teórico.

Ejemplo 10.

310

Procédase según se indica en el ejemplo 2, utilizando 36,5 g. de cloruro del ácido 5-metil-3-fenil-4-isoxazólico en lugar del cloruro del ácido fenoxiacético.

Se obtienen 52,9 g. de oxacilina con una potencia del 95,8%, con un rendimiento del 82,7%, calculado sobre el valor teórico.

Ejemplo 11.

315

Procédase según se indica en el ejemplo 1, utilizando 42,5 g. de cloruro del ácido 3-ortocloro-fenil-5-metil-4-isoxazólico en lugar del cloruro del ácido fenoxiacético.

320

Se obtienen 61 g. de cloxacilina, con una potencia del 95,3%, con un rendimiento del 95,3%, calculado sobre el valor teórico.

Ejemplo 12.

325

Procédase según se indica en el ejemplo 2, utilizando 42,5 g. de cloruro del ácido 3-ortocloro-fenil-5-metil-4-isoxazólico, en lugar del cloruro del ácido fenoxia

340130



-13-

cético.

Se obtienen 60,1 g. de cloxacilina con una potencia del 94,6% con un rendimiento del 86% calculado sobre el valor teórico.

330

Ejemplo 13.

Procédase según se indica en el ejemplo 1, utilizando 48,2 g. de cloruro del ácido 3-(2,6-diclorofenil)-5-metil-4-isoxazólico en lugar del cloruro del ácido fenoxiacético.

335

Se obtienen 59 g. de dicloxacilina con una potencia del 93,5%, con un rendimiento del 78%, calculado sobre el valor teórico.

Ejemplo 14.

340

Procédase según se indica en el ejemplo 2, utilizando 48,2 g. de cloruro del ácido 3-(2,6-diclorofenil)-5-metil-isoxazólico en lugar de cloruro del ácido fenoxiacético.

345

Se obtienen 56,3 g. de dicloxacilina con una potencia del 93%, con un rendimiento del 74%, calculado sobre el valor teórico.

Ejemplo 15.

Procédase según se indica en el ejemplo 1, utilizando 36,4 g. de cloruro del ácido 2,6-dimetoxifenílico, en lugar del cloruro del ácido fenoxiacético.

350

Se obtienen 48,1 g. de metecilina con una potencia del 97%, con un rendimiento del 80% calculado sobre el valor teórico.

Ejemplo 16.

355

Procedáse según se describe en el ejemplo 2, utilizando 30,4 g. de cloruro del ácido 2,6-dimetoxifenílico



340130

en lugar de cloruro del ácido fenoxiacético.

Se obtienen 47,5 g. de meticilina con una potencia del 94,8% con un rendimiento del 77,2% calculado sobre el valor teórico.

360

===oooOooo===

N O T A . - Se reivindica la propiedad de ésta Patente de Invención:

365

1) - Procedimiento para la producción de penicilinas semisintéticas, en el que el ácido 6-aminopenicilánico es selectivamente absorbido en resinas aniónicas.

2) - Procedimiento para la producción de penicilinas semisintéticas, según las reivindicaciones 1 y 2, en el que la reacción tiene lugar entre cloruros ácidos y ácido 6-aminopenicilánico absorbido en resinas aniónicas.

370

3) - Procedimiento para la producción de penicilinas semisintéticas, según se describe en los ejemplos.

4) - Procedimiento para la producción de penicilinas semisintéticas, según se reivindica en las reivindicaciones 1 a 4.

375

5) - "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE PENICILINAS SEMISINTÉTICAS".

Esta Memoria Descriptiva consta de catorce hojas foliadas y mecanografiadas por una sola cara.

Madrid, - 3 MAYO 1967
C. ALONSO
Per p. *[Signature]*