



1970

No. 365.631

SECCION TECNICA
ASIGNACION I. P. C.
CLASE <u>C-07</u>
SUBCLASE <u>D</u>

# MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

## PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: BEECHAM GROUP LIMITED

RESIDENCIA: Beecham House, Great West Road, -  
BRENTFORD, MIDDLESEX, INGLATERRA.

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION  
DE ACIDO 6-AMINOPENICILANICO".

Prioridad: Patente británica n.º 16446 del 5-4-68



1           Este invento se refiere a una preparaci3n de onzimas,  
y especialmente a la obtenida a partir de enzimas desacila-  
sa conocidos por romper la uni3n amido en las penicilinas.

5           Un objeto del presente invento es proporcionar pre-  
paraciones enzimáticas insolubles en agua que pueden ser  
recuperadas de la mezcla de reacci3n para ser utilizadas  
de nuevo y constituyen una forma conveniente para el alma-  
cenamiento y transporte del enzima. Tambi3n el ácido 6-ami-  
nopenicilánico resultante es más puro que cuando se utili-  
10          za la amidasa de penicilina soluble en agua, en su prepa-  
raci3n a partir de penicilinas, ya que no se encuentran pre-  
sentes en el producto trazas del propio enzima.

15          Por consiguiente, el presente invento proporciona una  
preparaci3n enzimática insoluble en agua que contiene un  
enzima desacilasa conocido por romper la uni3n amido en las  
penicilinas y unido a un material polimérico inerte insolu-  
bl. en agua.

20          De preferencia el enzima desacilasa se obtiene a par-  
tir de bacterias, como las variedades de Escherichia coli,  
cuando se utiliza para descomponer la bencilpenicilina en  
ácido 6-aminopenicilánico; o, por ejemplo, a partir de hongos  
y actinomicetes cuando se utiliza para la descomposici3n de  
fenoximetilpenicilina.

25          Los materiales poliméricos preferidos son bromoace-  
tilcelulosa y el derivado azido de carboximetilcelulosa. Los  
derivados insolubles en agua pueden ser preparados, por ejem-  
plo, por los métodos descritos en las patentes inglesas  
916.931 y 1.062.596. El enzima se puede hacer reaccionar, por  
ejemplo, con bromoacetilcelulosa o copular con CM-Sephadex  
30          ("Sephadex" es una marca registrada), en presencia de un reac



DEC. 1970

1 tivo formador de anillo adecuado, con carbo-di-imida. Otros  
materiales poliméricos adecuados son ciertas resinas cambia-  
doras de ion activadas, como el cloruro de ácido de Zeckarb  
tipo 226 y resinas de etileno-anhídrido maleico reticuladas  
5 con hidrazina. Los derivados insolubles en agua retienen la  
actividad del enzima madre, pero en uso permanecen en la for-  
ma insoluble en agua y por lo tanto pueden ser utilizados  
en procesos continuos en columnas y otro tipo de equipo.

10 el invento también proporciona un procedimiento para  
la preparación de ácido 6-aminopenicilánico, cuyo procedi-  
miento consiste en poner en contacto bencilpenicilina o fe-  
noxibencilpenicilina con una preparación enzimática insolu-  
ble en agua como la definida anteriormente, en presencia de  
15 agua, separar la solución resultante del material sólido y  
recuperar el ácido 6-aminopenicilánico.

Con el enzima desacilasa producido por E. coli, la  
preparación insoluble en agua puede ser obtenida aislando  
primero y purificando el enzima libre y después copulándolo  
con el material polimérico.

20 El aislamiento del enzima puede efectuarse separando  
células de E. coli de un medio fermentado, matando las célu-  
las con formaldehído acuoso y recogéndolas por filtración  
o centrifugación. A continuación se descomponen las células  
y el enzima se separa del residuo celular por centrifugación  
25 y se purifica por precipitación con sulfato amónico y poste-  
rior cromatografía. Se encuentra que el enzima así obtenido  
es puro por electroforesis y tiene una elevada actividad es-  
pecífica en la scisisis de la bencilpenicilina.

30 Los siguientes ejemplos ilustran el invento. En estos  
ejemplos, una unidad midasa es numéricamente equivalente al

POOR  
QUALITY



NOV. 1970

1 la cantidad de ácido 6-aminopenicilánico (expresada en  $\mu\text{g}/$   
ml) producido en las condiciones del ensayo que son la enzi-  
mación de bencilpenicilina al 3,3 % durante  $1\frac{1}{2}$  horas a pH  
7,9 y  $37^{\circ}\text{C}$ .

5  EJEMPLO 1

El enzima obtenido a partir de E. coli se agita en so-  
lución acuosa con bromoacetilcelulosa a la temperatura am-  
biente durante 30 horas y a pH 5,8 para dar preparaciones  
con actividades de 30.000 a 250.000 unidades desacilasa/g.  
10 Estos materiales se conservan después a  $4^{\circ}\text{C}$  y pH 8,9 duran-  
te 12 horas para dar preparaciones con actividades de 13.000-  
100.000 unidades desacilasa/g. Las preparaciones enzimáticas  
se liberan del bromo que no ha reaccionado por tratamiento  
con etanolamina 0,05 M en agua a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y des-  
15 pués se lavan dos veces con solución acuosa 0,15 M de cloru-  
ro sódico, seguido de agua.

Con una preparación obtenida de esta forma, con una  
actividad de 40.000 unidades/g de bromoacetilcelulosa seca,  
se realizan en condiciones normales cuatro enzimaciones su-  
20 cesivas de bencilpenicilina en solución acuosa al 2 %. La  
eficiencia de todas las enzimaciones es satisfactoria y la  
preparación final que retiene la actividad es satisfactoria  
para ser utilizada de nuevo; de las mezclas de reacción se  
aisla ácido 6-aminopenicilánico con una pureza superior a  
25 90 %.

EJEMPLO 2

Se prepara por el método conocido el derivado azido  
de carboximetilcelulosa.

30 A continuación se agitan 30 g de azido-carboximetil-  
celulosa en 3000 ml de solución reguladora 0,05 M de fosfa-



1970

1 te a pH 8,7 y sobre ésta se añaden  $5 \times 10^6$  unidades de en-  
zima amidasa puro (procedente de E. coli). La mezcla se agi-  
ta a 4°C durante 24 horas. La preparación activa se centri-  
fuga y el sólido se lava sucesivamente con NaCl 1 M, NaHCO<sub>3</sub>  
5 0,5 M, NaCl 1 M y finalmente con agua. Se encuentra que,  
después de la centrifugación final, el sólido tiene una  
actividad de 100.000 unidades/g de azido-carboximetilcelulosa.

Otra preparación utilizando el método anterior y con  
una actividad de 34.300 unidades/g de azido-carboximetil-  
10 celulosa seca se emplea para dos enzimaciones consecutivas  
de bencilpenicilina al 2 % en una vasija de 400 ml, a pH  
7,8 y 37°C. Al final de la primera enzimación se recupera  
la preparación activa para ser utilizada de nuevo en la se-  
gunda; se obtienen eficiencias de enzimación comparables  
15 en ambos experimentos (67 y 70 %, respectivamente).

### EJEMPLO 3

Se agitan 200 mg de resina polimérica de etileno/an-  
hidrido maleico (EHA 21) en 25 ml de tampón de fosfato a  
20 pH 7,6 y 5°C. Se añade el agente de reticulación, 2 ml de  
solución al 1 % de hidrato de hidrazina, seguido al cabo  
de 1 a 2 minutos por 10 mg de enzima amidasa pura (de E.  
coli y con una actividad de  $5,7 \times 10^7$  unidades/g) disueltos  
en una pequeña cantidad de tampón de fosfato. La mezcla se  
25 agita en el baño de hielo durante 2 horas y después se man-  
tiene a 5°C durante la noche. Se recupera la preparación  
activa, se lava en la forma descrita en el Ejemplo 2 y se  
encuentra que tiene una actividad de 360.000 unidades/g  
de resina seca.

30 Otros experimentos utilizando el mismo método dan  
actividades del orden de 100.000 a 600.000 unidades/g de

POOR  
QUALITY



1 resina seca.

EJEMPLO 4

5 Se convierte el Zeokarb 226 en el cloruro de ácido calentando a reflujo con cloruro de tionilo y dimetilformamida en cloroformo. La proporción de cloro es de 14 %.  
10 Sobre 30 ml de tampón de fosfato a pH 7,6, conteniendo 250.000 unidades de enzima amidasa puro (de E.coli) se añade 1,0 g del cloruro de ácido de Zeokarb 226 y la mezcla de reacción se agita durante 5 horas a 5°C. Se recupera la preparación activa, se lava en la forma descrita en el ejemplo 2 y se halla que tiene una actividad de 119.000 unidades/g de cloruro de ácido de Zeokarb 226 seco.

EJEMPLO 5

15 Se convierte Zeokarb 225 en el cloruro de sulfonilo calentando a reflujo con oxiclорuro de fósforo. La proporción de cloro es de 12,5 %. Sobre 30 ml de tampón de fosfato a pH 8,5, conteniendo 270.000 unidades de enzima amidasa pura (de E.coli) se añade 1,0 g de cloruro de sulfonilo de Zeokarb 225 y la mezcla de reacción se agita durante 5  
20 horas a 5°C. Se recupera la preparación activa, se lava en la forma descrita en el ejemplo 2 y se encuentra que tiene una actividad de 4.800 unidades/g de cloruro de sulfonilo Zeokarb 225 seco.

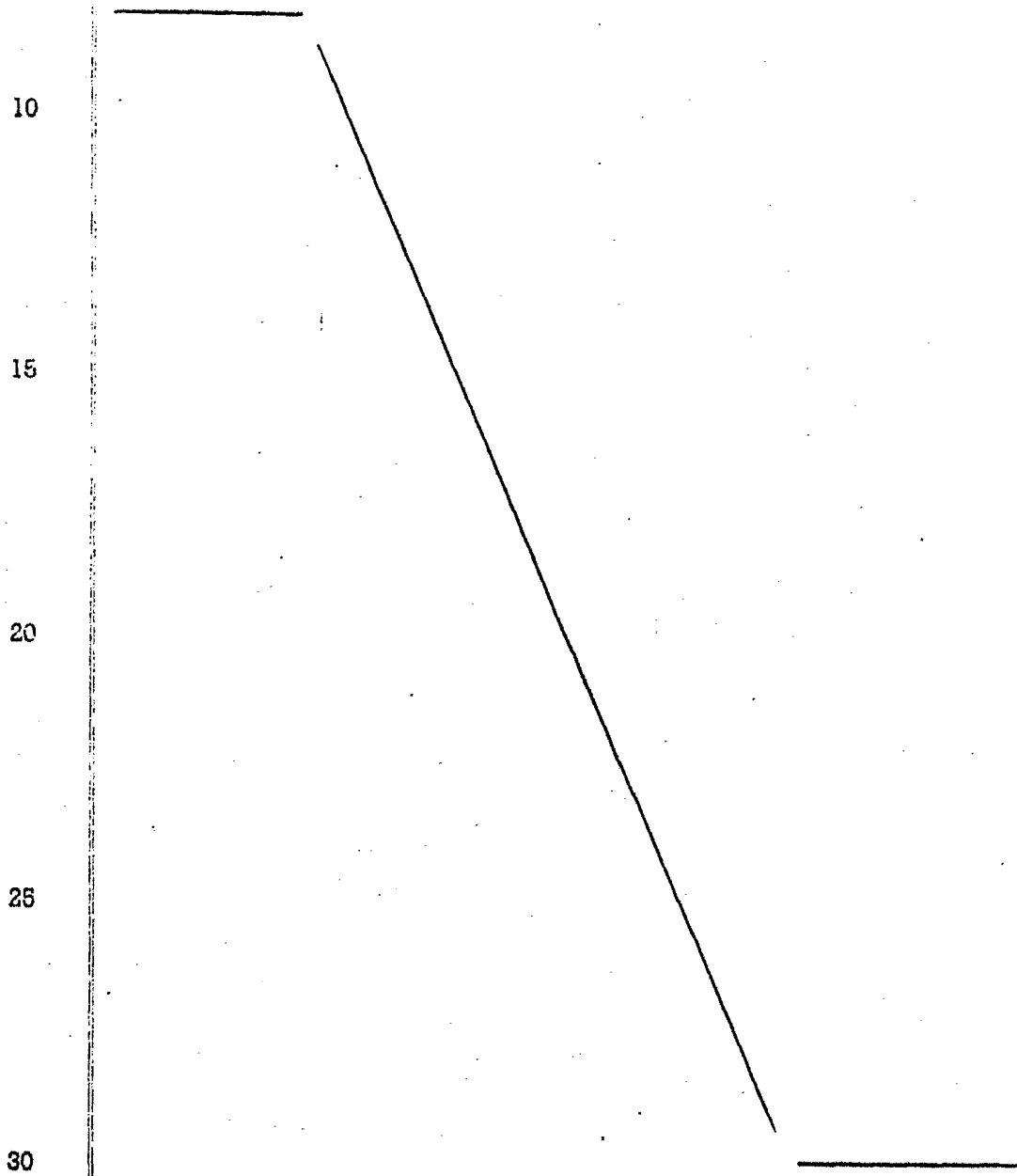
EJEMPLO 6

25 Se convierte carboximetilcelulosa en el cloruro de ácido por reacción con cloruro de tionilo y dimetilformamida en piridina. La proporción de cloro es de 9,9 %. Sobre 30 ml de tampón de fosfato a pH 8,5, conteniendo 270.000 unidades de enzima amidasa puro (de E.coli) se añade 1,0 g  
30 del cloruro de ácido de carboximetilcelulosa y la mezcla



1 de reacción se agita durante 2½ horas a 5°C. Se recupera  
la preparación activa, se lava en la forma descrita en el  
Ejemplo 2 y se encuentra que tiene una actividad de  
5 11.900 unidades/g de cloruro de ácido de carboximetilcelu-  
losa seco.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita  
recaerá sobre las siguientes:





DIC. 1977

1

REIVINDICACIONES

5

1.- Un procedimiento para la preparación de ácido 6-aminopenicilánico que consiste en poner en contacto bencilpenicilina o fenoximetilpenicilina, o una sal no tóxica de las mismas, con una preparación enzimática que contiene un enzima desacilasa conocido por escindir la unión amido en las penicilinas y unido a un material polimérico inerte insoluble en agua en presencia de agua, separar la solución resultante del material sólido y recuperar de la misma el ácido 6-aminopenicilánico.

10

2.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, en la que el enzima desacilasa deriva de bacterias.

3.- Un procedimiento según la Reivindicación 2, en la que el enzima desacilasa deriva de Escherichia coli.

15

4.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, en la que el enzima desacilasa deriva de hongos o actinomicetes.

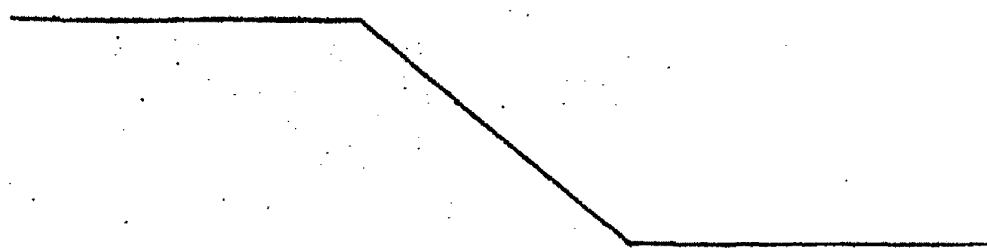
5.- Un procedimiento, según las Reivindicaciones 1 a 4, en la que el material polimérico insoluble en agua es bromoacetilcelulosa, ácido-carboximetilcelulosa, resina polimérica de etileno/anhidrido maleico reticulada con hidrazina o cloruro de ácido de carboximetilcelulosa.

20

6.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ACIDO 6-AMINOPENICILANICO".

25

30





C. 1070

1

Todo tal y como queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva que consta de nueve páginas - mecanografiadas.

5

Madrid, 2 de Abril de 1.969

BERNARDO UNGRIA  
P.P.

10

15

20

25

30