

P - 45.647

FA-7006/RT-EISAI

383293

GECCION TECNICA
CLASIFICACION I.P.C.
CLASE <u>C07</u> <u>A.61</u>
SUBCLASE <u>D</u> <u>K</u>

Memoria descriptiva

383293



para solicitar PATENTE DE INVENCION en ESPAÑA por 20 años

a nombre de EISAI KABUSHIKI-KAISHA

entidad / ~~de nacionalidad~~ japonesa

con domicilio en 6-10, 4-chome, Koishikawa, Bunkyo-ku,
Tokyo, Japon

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE D-(-)- α -AMINO-
BENCILPENICILINA"
(Clase Internacional C07d)



Esta Invención se refiere a un procedimiento para la producción de "D-(-)- α -aminobencilpenicilina, a la que se denomina mas adelante, en esta memoria, ampicilina.

Según el procedimiento de la presente Invención, se produce ampicilina, eficazmente, haciendo reaccionar el ácido 6-amino penicilánico, con un derivado funcional del ácido D-(-)- α -aminofenilacético, en presencia de una nueva bacteria, que pertenece al género *Flavobacterium*, o de una enzima producida por ella, omitiéndose para simplificar en lo sucesivo el prefijo "D-(-)-" que figura anteriormente. La nueva bacteria utilizada en el procedimiento de la presente Invención se descubrió en el suelo de una determinada zona situada en la prefectua de Osaka, del Japón, y se aisló de allí mediante los presentes inventores.

Se conocen ya en la técnica varios métodos con respecto a la preparación sintética de penicilinas, tales como la ampicilina, mediante reacción química pura del ácido 6-aminopenicilánico y el anhídrido o cloruro del ácido - α -aminofenilacético, o semejante. Sin embargo, se sabe que la preparación sintética de penicilinas, que no se encuentran naturalmente, mediante la reacción química pura, tiene el inconveniente que de racemizar el resto acilo de la penicilina resultante, lo que depende de las condiciones de reacción a emplear. Además, estos métodos sintéticos son susceptibles de ir acompañados de reacciones secundarias indeseables, tales como descomposición, hidrólisis y polimerización de las sustancias reaccionantes y de los productos de la reacción, durante el transcurso de la reacción.

383293



Existe otro método, conocido como "método enzimático", para producir penicilinas semi-sintéticas, en el que se emplea, como catalizador, un microorganismo determinado o enzima producida por éste. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. Nº 3.079.306, describe un método para producir ácidos 6-(acil tipo fenoxi)aminopenicilánico, mediante una reacción de condensación enzimática del ácido 6-aminopenicilánico y un derivado funcional de un cierto ácido fenoxi-carboxílico, tal como un éster, amida o sal del mismo, en presencia de una suspensión celular de *Escherichia coli*.

Además, la Publicación de Patente Sud Africana Nº 3.870/62, menciona otro método para producir ampicilina, mediante una reacción de condensación enzimática del ácido 6-aminopenicilánico con el éster etílico o la amida del ácido α -aminofenilacético, en presencia de bacterias tales como *Escherichia coli*, *Alcaligenes faecalis*, *Aerobacter aerogenes*, *Proteus*, *Salmonella*, *Micrococcus* y *Arthrobacter*.

Como puede verse en las descripciones de las Memorias Descriptivas de las Patentes mencionadas, todas las bacterias, así como las enzimas formadas por ellas, denominadas "penicilín-amidasas", utilizadas ambas en los métodos conocidos, se seleccionan entre aquellas que son capaces de inactivar, en el plazo de 24 horas, al menos el 20 por ciento de la actividad de la penicilina G, dando por resultado la formación de una solución debida a un desdoblamiento parcial del enlace amídico existente entre los grupos fenilacetilo y amino en posición 6, de la penicilina G como sustrato, cuando ésta última se



-8 00

pone en contacto con las amidases bajo ciertas condiciones. La actividad perdida de la penicilina G, en la solución resultante, puede restaurarse, al menos en parte, cuando se trata la solución con cloruro de fenilacetilo.

5 Así, pues los métodos de la técnica anterior están basados en el descubrimiento del hecho de que las denominadas "penicilín-amidasas" son capaces de facilitar el enlace de un grupo acilo y el grupo amino del ácido 6-aminopenicilánico, en medio ácido, sabiéndose, primeramente, que dichas penicilín-amidasas son capaces de desdoblarse el enlace 6-amido de la penicilina G, en medio alcalino.

15 En estos casos, se aprecia que aunque estas enzimas particulares muestran una notable actividad catalítica para general penicilina G natural, exhiben una actividad catalítica considerablemente pobre para producir penicilinas semi-sintéticas.

20 Bajo estas circunstancias, es difícil obtener las penicilinas semi-sintéticas deseadas, con una productividad comercialmente asequible, aún cuando el sustrato se emplee a concentraciones elevadas.

25 Por consiguiente, el principal objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la producción selectiva y eficaz de ampicilina, acilando enzimáticamente el ácido 6-aminopenicilánico como sustrato, en una concentración elevada, con un derivado funcional del ácido α -aminofenilacético, sin reacciones secundarias indeseables concurrentes que implican racemización y descomposición, que podrían tener lugar en los métodos químicos puros conocidos, para producir penicilinas semi-sin



téticas.

Con el fin de conseguir el objeto anterior, se tuvo éxito, después de una investigación extensa, al localizar y aislar una bacteria particular, perteneciente al género *Flavobacterium*, a la que se dió el nombre de "Flavobacterium 44-102". La bacteria se caracteriza por el hecho de que produce una penicilín-amidasa que se distingue totalmente de las enzimas o penicilín-amidasas conocidas hasta la fecha, en virtud de su excelente actividad catalítica para producir ampicilina, más bien que penicilina G, a partir del ácido 6-aminopenicilánico. Se ha establecido aquí, según la presente Invención, un nuevo método enzimático para preparar ampicilina, utilizando dicha bacteria.

Las características morfológicas y fisiológicas de la cepa de la bacteria, son las siguientes:

A. Observaciones microscópicas en ágar nutriente

(1) Aspecto:

Células de forma de barra recta, con extremos redondeados, casi aisladas, algunas veces en pares, pero no en cadenas largas o masas irregulares.

(2) Tamaños : 0,5-0,8 a 2,0-2,5 micras.

(3) Motilidad: Ninguna

(4) Flagelos: Ninguno

(5) Formación de esporos: Ninguna

(6) Cepa Gram: Negativo.

B. Características morfológicas

1. Caldo nutriente a 27°C durante 96 horas:

383293



Turbio con un ligero sedimento blanco y con un anillo sobre la superficie

2. Agar nutiente:

(1) Cultivo inclinado a 27°C durante 48 horas:

5 Crecimiento abundante, mucoso, amarillo y brillante; no crece a una temperatura de unos 37°C; con pigmento insoluble en agua.

(2) Cultivo en placa a 27°C durante 48 horas:

Colonias mucosas, amarillas y brillantes

10 3. En caldo nutriente de glucosa, a 27°C durante 96 horas:

Un anillo uniformemente turbio sobre la superficie

4. Agar nutriente a 27°C durante 96 horas:

15 Crecimiento ligeramente lento; colonias mucosas, amarillas y brillantes, con pigmento insoluble en agua.

5. Cultivo en fragmento de gelatina a 20°C durante 96 horas:

20 Crecimiento solo en la superficie, colonias amarillas, no crece en el fragmento, licuación u/a o casi nula.

6. Tornasol-leche:

27°C. Después de 158 horas, blanco descolorido, no hay cambio en el valor del pH y no hay coagulación.

7. Agar inclinado con sales inorgánicas y glucosa:

25 A 27°C durante 7 días, desarrollo muy lento de células amarillas.

C. Propiedades fisiológicas:

1. Crecimiento bueno a 24°C; no hay crecimiento a 37°C

30



-8

2. Necesidad de oxígeno: Aerobio
3. Reducción de nitrato a nitrito: Negativa
4. Producción de indol: Negativa
5. Producción de sulfuro de hidrógeno: Negativo
- 5 6. Licuación de ágar: Negativa
7. Licuación de gelatina: Negativa o débil
8. Necesidad de sales para el crecimiento: Negativa
9. Sobre trozo de patata: Lista amarilla
10. Actividad de catalasa: Positiva
- 10 11. Hidrolisis de almidón: Negativa
12. Coloración rápida de ácido: Negativa
13. Utilidad o asimilación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético como fuente de carbono: Negativa

15 D. Ensayo de fermentación con hidratos de carbono

No tienen lugar formaciones de ácidos y gases en contacto con:

Ribosa, xilosa, glucosa, fructosa, galactosa, sorbosa, arabinosa, rafinosa, lactosa, sacarosa, ramnosa, manosa, maltosa, melibiosa, melecitosa, trehalosa, dextrina, 20 almidón, glicerina, xilita, eritrita, sorbita, adnita, inosita, manita, esculina, salicina e inulina.

Comprobando los datos anteriores, conforme a las enseñanzas de Bergey en "Manual of Determinative Bacteriology", 7ª edición, es seguro que existe una cierta semejanza entre las características de la bacteria especificada y la *Flavobacterium peregrinum* conocida. Sin embargo existe una distinción clara entre las dos, debido a que la primera de las bacterias muestra características tales 25 como licuación de la gelatina considerablemente débil, de- 30



bilitación fuerte del tornasol-leche y no utilización o asimilación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Por consiguiente, es obvio que la *Flavobacterium* EF 44-102, es una nueva bacteria que se distingue de las conocidas. Los especímenes de dicha nueva bacteria han sido depositados en el FERMENTACION RESEARCH INSTITUTE de JAPON bajo la denominación FERM-P No 343, así como en la AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, bajo el Número asignado ATCC 21429.

Como se ha mencionado en diversas comunicaciones y Memorias Descriptivas de Patentes se han obtenido diversas penicilín-amidasas con la ayuda de varios microorganismos. Estos se clasifican, generalmente, en dos grupos, según sus comportamientos enzimáticos individuales frente a sustratos penicilínicos. El primer grupo deriva de las bacterias y es capaz de hidrolizar fácilmente la penicilina G, y el segundo grupo está ampliamente distribuido entre *Actinomyces* y hongos Filamentous, y es capaz de desdoblar, rápidamente, la penicilina V y la penicilina K. Por ejemplo, según el artículo de C.A. Claridge en "Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine", 113, 1008 (1963) penicilín-amidasas originadas a partir de *Alcaligenes faecalis* y *Escherichia coli*, atacan a la penicilina G, la penicilina V, la ampicilina y semejantes, produciendo ácido 6-aminopenicilánico. Dicho artículo relaciona, además, que los rendimientos del ácido 6-aminopenicilánico así obtenido variará según la clase de sustratos penicilínicos a tratar. En cualquiera de los dos casos, se encontró que la penicilina G se desdobla más fácilmente por estas penicilín-amidasas.

383293



- 8 0 -

Tal conocimiento está completamente de acuerdo con la disposición general en los métodos enzimáticos conocidos.

Contrariamente a lo anterior, se observa, sorprendentemente, que la penicilín-amidasa particular, producida por la *Flavobacterium* EF 44-102 no muestra actividad apreciable alguna frente a la Penicilina G; cataliza la formación de solamente una cantidad pequeña de ácido 6-aminopenicilánico partiendo de penicilina V. Además, merece la pena hacer notar que la penicilín-amidasa de la bacteria especificada, exhibe una actividad enzimática peculiar frente a la ampicilina y desdobra casi cuantitativamente el enlace 6-amido de la ampicilina, conduciendo al ácido 6-aminopenicilánico, y que dicha penicilín-amidasa actúa como catalizador, produciendo casi cuantitativamente ampicilina a partir de ácido 6-aminopenicilánico y un derivado funcional del ácido α -aminofenilacético.

La existencia de dicha nueva y peculiar penicilín-amidasa, no era sospechada en absoluto, por lo expertos en la materia. Por tanto, ha sido establecido un procedimiento nuevo para la producción de ampicilina a escala comercial, según la presente Invención, utilizando dicha penicilín-amidasa.

La *Flavobacterium* EF 44-102, puede cultivarse en un medio nutritivo que contiene cantidades apropiadas de fuentes nitrogenadas, orgánicas e inorgánicas, tales como peptona, extracto de carne, licor de macerado de maíz, levadura seca, hidrolizado de proteína de soja, extracto de soja y sales amónicas inorgánicas, así como fuentes de carbono, tales como melazas, glucosa, hidrolizado de almidón



- 8 00

y sales inorgánicas. El cultivo se efectúa mediante cualquiera de los procedimientos convencionales tales como cultivos en agitación, sumergidos y estacionarios, a una temperatura comprendida entre 10°C y 35°C, durante 12-48 horas.

Al llevar a cabo la reacción enzimática, según la presente invención, el microorganismo específico puede utilizarse en forma de un caldo de cultivo per se, de células bacterianas cosechadas, partiendo del caldo de cultivo, o de una suspensión celular. Sin embargo, debe entenderse que los productos celulares tratados mediante procedimientos mecánicos o químicos pueden utilizarse igualmente en forma de células secas, rotas o desdobladas, o en forma de preparación enzimática parcialmente purificada, al objeto de llevar a cabo el procedimiento de la presente Invención, en tanto en cuanto su actividad enzimática propuesta sea mantenida.

La reacción enzimática de la presente Invención se efectúa, habitualmente, introduciendo cualquiera de las células o productos celulares tales como los mencionados, en agua, con o sin solución tampón, que contengan el ácido 6-aminopenicilánico o una de sus sales, y un derivado funcional del ácido α -aminofenilacético.

El ácido 6-aminopenicilánico en forma de ácido libre o de una de sus sales, puede emplearse a una concentración comprendida dentro del intervalo de 0,1 a 20 mg/ml, calculada como ácido libre y se encuentra que se prefiere especialmente, una concentración comprendida entre 2 y 5 mg/ml.

Por otra parte, el ácido α -aminofenilacético en



800

5 calidad de agente acilante, debe emplearse en forma de sus derivados funcionales reactivos, tales como ésteres y amidas del mismo, debido a que al estado de ácido libre dicho compuesto casi no reacciona con el ácido 6-aminopenicilánico bajo la condición de reacción enzimática a emplear.

10 El agente acilante puede emplearse en el intervalo de 2 a 20 moles por mol del ácido 6-aminopenicilánico. La proporción molar del agente acilante respecto al ácido 6-aminopenicilánico puede variarse adecuadamente, sin embargo, según sea la concentración del último en la mezcla de reacción a emplear. En una realización explicativa, es preferible una proporción de 15 mg/ml de clorhidrato del éster metílico del ácido α -aminofenilacético a 4 mg/ml de ácido 6-aminopenicilánico, en la mezcla de reacción. La
15 concentración del clorhidrato del éster metílico corresponde a un exceso cutaro veces molar, comparado con la concentración de dicho ácido 6-aminopenicilánico. La reacción enzimática se lleva a cabo dejando en estado estacionario, sacudiendo o agitando la mezcla de reacción, a una temperatura de 25^o-50^oC durante 0,5-24 horas, mateniendo el valor del pH de la mezcla en el intervalo de 4 a 8, aproximadamente. Se ha encontrado que es preferible un valor del
20 pH de 5,5 a 6,5, aproximadamente.

25 A continuación, se proporcionan unos pocos experimentos, al objeto de comprender bien el comportamiento enzimático peculiar frente a penicilinas, de la penicilín-amidasa especificada, producida por la Flavobacterium EF 44-102, en comparación con los comportamientos presentados por las penicilín-amidasas bacterianas conocidas hasta la
30 fecha.



-8 000

Experimento 1

Se inocularon con *Flavobacterium* EF 44-102, 100 ml de medio de cultivo, a un pH de 7,1, que contenía 5% de extracto de soja, 0,1% de extracto de levadura, 0,1% de extracto de carne, 0,5% de líquido de macerado de maiz, 2% de glucosa, 0,4% de KCl, 0,5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0,02% de K_2HPO_4 . El conjunto se cultivó a 27°C durante 24 horas con un agitador de vaivén. Una vez terminado el cultivo, se recogieron las células bacterianas mediante centrifuga. Las células vivas cosechadas se volvieron a suspender en 40 ml de una solución tampón decimolar de fosfato (pH = 7,0)

Se diluyeron con un volumen igual de dicho tampón decimolar de fosfato, cinco ml de la suspensión celular así obtenida. Se añadieron después 5.000 U.I. de penicilina G, y el líquido se sometió a reacción enzimática, a 37°C, durante 5 horas.

Se valoró después la actividad antibiótica del líquido así obtenido mediante un método en placas, frente a *Staphylococcus aureus* F.D.A. 209 p. No se apreció disminución de la actividad de la penicilina G, después del experimento. El líquido se acidificó después y se extrajo con éter dietílico al objeto de separar la penicilina G que permanecía sin cambio, y la fase acuosa remanente se trató con cloruro de fenilacetilo. No se apreció aparición de actividad antibiótica aumentada en la fase.

Experimento 2

Se repitió la reacción enzimática del Experimento 1 utilizando ampicilina en lugar de penicilina G. Se encontró que la actividad antibiótica particular de la ampi-



5 cilina desaparecía completamente. La solución acuosa tratada, como está, o después de inmersión en un disco de panel, vendido por la firma The Toyo Roshi K.K. de Japón, se sometió a fenilacetilación mediante el procedimiento convencional. Se reconoció una sustancial restauración de la actividad penicilínica.

10 A partir de los experimentos anteriores, resultó confirmado el que la Flavobacterium EF 44-102 a utilizar en la presente invención, no exhibe actividad de amidasa alguna, frente a la penicilina G, mientras que exhibe una actividad de amidasa potencial frente a la ampicilina, lo que da como resultado la formación de ácido 6-aminopenicilánico.

15 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención, pero no significan limitación de la Invención.

Ejemplo 1

20 Se inocularon con Flavobacterium EF 44-102, 100 ml de medio de cultivo (pH=7,0) que contenía 1% de extracto de carne, 1% de polipeptona y 0,5% de NaCl. El conjunto se mantuvo entonces a 27°C, durante 48 horas, mientras se sacudía. La solución de cultivo se ajustó a pH = 7,5 añadiendo solución normal de NaOH.

25 Se añadieron a la solución, 100 ml de tampón de fosfato decimolar (pH = 7,5) que contenía 4 mg/ml de ácido 6-aminopenicilánico y 30 mg/ml de clorhidrato del éster metílico del ácido α-aminofenilacético. El conjunto se incubó a 37°C durante 4 horas.

30 Una vez terminada la reacción, se estimó la actividad antibiótica de la mezcla de reacción frente a Staphy-

383293



lococcus Aureus F.D.A. 209 P. Se encontró una actividad correspondiente a 3,1 mg/ml de ampicilina. Una cantidad más pequeña de la mezcla se depositó en gotas sobre un trozo de Papel de Filtro Nº 50, vendido por la firma
5 Toyo Roshi K.K. de Japón y se sometió a cromatografía en papel utilizando como sistema disolvente butanol: etanol: agua de 5:1:4 (como capa superior) y otro sistema disolvente constituido por piridina: isopropanol:agua de 5:65:30. Se encontró que la sustancia activa mostraba valores
10 de Rf de 0,3 y 0,6 respectivamente. Los valores concuerdan con los de una muestra auténtica de ampicilina.

Ejemplo 2

Se repitió la reacción enzimática del Ejemplo 1, utilizando una cantidad equimolecular de clorhidrato del
15 éster etílico del ácido α -aminofenilacético en lugar del clorhidrato del éster metílico. Se obtuvo de este modo una mezcla de reacción que tenía una actividad antibiótica correspondiente a 2,8 mg/ml de ampicilina.

20

Ejemplo 3

Se inoculó con Flavobacterium EF 44-102 un medio de cultivo (pH=7,1) que contenía 5% de extracto de soja, 0,1% de extracto de levadura, 0,1% de extracto de carne,
25 0,5% de líquido de macerado de maíz, 2% de glucosa, 0,4% de KCl, 0,5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0,02% de K_2HPO_4 . El conjunto se cultivó entonces a 27°C durante 45 horas, mientras se agitaba. La masa celular obtenida por centrifugación de 1 litro del caldo de cultivo, que corresponde a 3,5 gra-
30 mos de células secas, se suspendió en 1 litro de agua des-

383293



tilada. La suspensión acuosa resultante se vertió en 1 litro de solución acuosa que contenía 8 gramos de ácido 6-aminopenicilánico y 30 gramos de clorhidrato del éster metílico del ácido α -aminofenilacético, y se ajustó el valor del
5 pH de la mezcla resultante a 7,5. Se efectuó la reacción enzimática de la mezcla, a 37°C, durante 2 horas.

Se valoró la actividad antibiótica de la mezcla resultante, conforme al procedimiento mencionado en el Ejemplo 1. Se encontró que el sustrato, ácido 6-aminopenicilánico, se había acilado casi completamente a ampicilina. La mezcla de reacción se centrifugó para separar
10 las células bacterianas, y la capa acuosa así obtenida se trató con la resina de cambio iónico Dowex - 1 x 2 (100-200 mallas), según la manera habitual. La solución acuosa así obtenida se liofilizó obteniéndose 10,6 gramos de polvo blanco. La valoración de la actividad antibiótica,
15 frente a E.coli NIHJ, del polvo, dió una pureza del 82% de ampicilina.

20 Ejemplo 4

Las células de cultivo obtenidas por un procedimiento semejante al mencionado en el Ejemplo 3, se suspendieron en una solución tampón de fosfato, decimolar, (pH = 7,5) y la suspensión resultante fué sometida a
25 tratamiento por sonido durante 5 min., bajo enfriamiento con hielo, para romper las células bacterianas. La solución tratada se centrifugó obteniéndose una solución de enzima transparente. La reacción enzimática se llevó a cabo según el Ejemplo 1 utilizando dicha solución de enzima. Se
30 obtuvo de este modo una solución que tenía una actividad

383293



antibiótica correspondiente a 1,8 mg/ml de ampicilina.

Ejemplo 5

5 Se inoculó *Flavobacterium* EF 44-102 a un medio de cultivo que tenía la misma composición que el del Ejemplo 3. El conjunto se cultivó a 27°C durante 20 horas, mientras se agitaba.

10 Se añadieron 150 ml del líquido cultivado a 15 litros del mismo medio de cultivo antes mencionado, que se mantuvo en un recipiente de fermentación, y el cultivo se llevó a cabo a 27°C durante 24 horas, mientras se agitaba a 350 rpm y se pasaba aire a través del medio a la velocidad de 30 litros por minuto.

15 El líquido cultivado se centrifugó para recuperar las células bacterianas. Las células se suspendieron en 1,5 litros de agua destilada, se centrifugó y se suspendió de nuevo en 750 ml de agua destilada. La suspensión celular se liofilizó entonces, obteniéndose 32 gramos de células secas.

20 3 gramos de las células secas se añadieron a un litro de una solución acuosa que contenía 5 gramos de ácido 6-aminopenicilánico y 8 gramos de clorhidrato del éster metílico del ácido α -aminofenilacético, habiéndose ajustado a 6,2 el valor del pH. La mezcla de reacción así
25 obtenida se agitó, a 37°C. Después de transcurridos 30 minutos, se añadieron, además, 6 gramos de clorhidrato del éster metílico del ácido α -aminofenilacético. Además se siguieron las adiciones respectivas de 4, 2, 2, y 2
30 gramos de clorhidrato del éster metílico del ácido α -aminofenilacético a intervalos de 30 minutos cada una. La

383293



-8 00

reacción enzimática se completó después de 3 horas.

El contenido en ampicilina en la mezcla de reacción se determinó según el método descrito por J.W.G. Smith y otros (comp.; Analyst, 92, fig. 247-252, (1967).

5 Se registró la formación de 5,45 mg/ml de ampicilina, lo que corresponde a una conversión del 79,5% del ácido 6-aminopenicilánico.

10 La mezcla de reacción se centrifugó bajo enfriamiento para separar las células. El líquido separado se trató con la resina y se liofilizó según el procedimiento dado en el Ejemplo 3.

15 Se obtuvieron 6,2 gramos de ampicilina en forma de polvo blanco. La valoración de la actividad antibiótica del polvo frente a E.coli NIHJ, dió una pureza del 80,7 de ampicilina.

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Japón 2 de Septiembre de 1969 bajo el Nº.69.075/69, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

20

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, ppr VEINTE años, son los siguientes:

25

1.- Un procedimiento para la producción de

5.10.70

- 17 -

383293

8 OCT



D-(-)- α -aminobencilpenicilina o sales de la misma que comprende hacer reaccionar el ácido 6-aminopenicilánico o una de sus sales con un derivado funcional del ácido D-(-)- α -aminofenilacético, en presencia de células, materiales de células de Flavobacterium EF 44-102 (ATCC 5
Nº 21429), o preparaciones ezcimáticas obtenidas a partir de las mismas.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo se utiliza en forma de células bacterianas del mismo. 10

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo se utiliza en forma de caldo de cultivo del mismo.

4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el microorganismo se utiliza en forma de preparación enzimática del mismo. 15

5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el derivado funcional del ácido D-(-)- α -aminofenilacético es un éster o una amida de dicho ácido; o su sal por adición de ácido. 20

6.- Un procedimiento según la reivindicación 5, en el que el éster del ácido D-(-)- α -aminofenilacético, es el éster metílico de dicho ácido; o su sal por adición de ácido.

7.- Un procedimiento según la reivindicación 5, en el que el éster del ácido D-(-)- α -aminofenilacético, es el éster etílico del ácido; o su sal por adición de ácido. 25

8.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que se emplean 2-20 moles del derivado funcional del ácido D-(-)- α -aminofenilacético, por mol de ácido 30

5.10.70



- 8 0

6-aminopenicilánico o sal del mismo.

9.- Un procedimiento según la reivindicación 1 anterior, en el que la reacción enzimática del ácido 6-ami
5 nopenicilánico o una de sus sales, y el derivado funcional del ácido D-(-)- α -aminofenilacético, se lleva a cabo en un medio acuoso que tiene un pH comprendido entre 4 y 8.

10.- Un procedimiento para la producción de D-(-)- α -aminobencilpenicilina.

10 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de diecinueve hojas escritas a máquina por una sólo cara.

Madrid,

- 8 OCT. 1970

P. A.

Alberto de Ezaburu
Por Poderes

5.10.70

BPD/.