



1972

384025

384025

SECCION TECNICA	_____
CLASIFICACION I.P.C.	_____
CLASE <u>C07</u>	_____
SUBCLASE <u>D</u>	_____

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

a favor de

AKTIEBOLAGET ASTRA, de nacionalidad sueca, residente en Södertälje (Suecia), por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ESTERES DE ACIDO 6-AMINOPENICILANICO"

Memoria Descriptiva

Esta Patente se refiere a un método perfeccionado para la producción de ésteres de ácido 6-aminopenicilánico por degradación enzimática de un éster de penicilina, mediante una solución acuosa de una penicilin-acilasa libre de células.

5

Se sabe que muchos microorganismos, tanto bacterias como hongos, producen enzimas que pueden hidrolizar el enlace amida en la posición 6 de las penicilinas y que, en general, se denominan penicilin-acilasas o amidasas (para

- 2 -  
384025



10 un resumen de ésto, véase J.M.T. Hamilton-Miller "Bacterio-  
logical Reviews 30 (1966) 761). En la actual producción in-  
dustrial de 6-APA, se usan de preferencia suspensiones de cé-  
lulas de E.coli que contienen una acilasa o amidasa. Sin em-  
bargo, estos procedimientos tienen diversos inconvenientes.  
15 Como el enzima es en gran medida intracelular, la penicilina,  
por necesidad, debe primero penetrar en los cuerpos de las cé-  
lulas a fin de reaccionar con el enzima, lo que dá como resul-  
tado una reacción más lenta. La <sup>e</sup>copa usada puede contener tam-  
bién otros enzimas que inactiven la penicilina, o el 6-APA for-  
20 mado, separando el enlace de beta-lactama, o que pueden conta-  
minar el cultivo celular con los organismos que producen tales  
enzimas. Como la acilasa constituye sólo una parte pequeñísima  
del contenido celular, un procedimiento que use los organismos  
enteros tiene un inconveniente práctico porque supone el empleo  
25 de grandes cantidades de material que son inactivas en el pro-  
ceso.

Otro inconveniente que se experimenta por el uso de  
organismos enteros es que debe añadirse una operación adicio-  
nal a la serie de procesos que conducen a la producción de pe-  
nicilinas semi-sintéticas, a saber, la separación (por ejem-  
30 plo, por filtración) de los organismos procedentes del líqui-  
do de reacción en los cuales la cadena secundaria original ha  
sido eliminada de las penicilinas biosintéticas. Otro incon-  
veniente es la pérdida de ácido penicilánico causada en parte



35 por adsorción sobre las células y en parte por degradaciones  
inducidas por materiales producidos durante el metabolismo  
celular. Todavía otro factor que tiende a causar problemas  
asociados con el uso de células enteras para la preparación  
de ácido 6-aminopenicilánico a partir de penicilinas biosin-  
40 téticas, es que la separación del ácido de los otros produc-  
tos de la reacción de escisión resulta bastante difícil. Así,  
Batchelor y col. (Lancet I (1968)1175) han informado que el  
6-APA obtenido por el empleo de células enteras puede conte-  
ner impurezas proteínicas capaces de provocar reacciones alér-  
45 gicas peligrosas en el hombre y el animal. Cuando se hacen pe-  
nicilinas de tales 6-APA contaminados, las impurezas pueden  
ser retenidas en los productos y llegar a ser responsables de  
muchas de las reacciones alérgicas observadas con estas peni-  
cilinas (G.T. Stewart, Amer. Heart J. (1968) 429). A fin de  
50 eliminar estas impurezas, el ácido 6-amino penicilánico, o  
las penicilinas preparadas a partir de él, deben someterse a  
procesos adicionales de separación que incluyen, por ejemplo,  
diálisis o filtración a través de un gel (Pat. Canadiense No.  
771.662). Se pierden de este modo grandes proporciones del 6-  
55 APA o de la penicilina, como se demostró por una recuperación  
de sólo 12 % de bencil-penicilina (Pat. británica nº 1078847)  
y de 56 % de fenoximetil-penicilina (Pat. británica número  
1114311).

Todos estos obstáculos pueden evitarse cuando se

384025



60 usa, de acuerdo con el presente invento, una preparación  
enzimática exenta de células o purificada. Así, los 6-APA  
formados por el uso de una preparación enzimática exenta  
de células o purificada de acuerdo con el invento para la  
65 separación del enlace amídico en la posición 6 de las peni-  
cilinas, se obtienen con buenos rendimientos y están sus-  
tancialmente exentos de impurezas proteínicas. Cuando el  
6-APA preparado de este modo es acilado, se obtienen peni-  
cilinas hipo-alérgicas con buenos rendimientos, sin puri-  
ficación adicional. En la bibliografía se han descrito di-  
70 versos intentos para obtener preparaciones enzimáticas pu-  
rificadas a partir de cepas de E.coli. Sorkar y col. (Hin-  
dustan Antibiotics Bull 4 (1961) 48, 152) trataron células  
suspendidas en un tampón de fosfato con ondas ultrasónicas  
y consiguieron una purificación de 25 veces por precipita-  
75 ción fraccionada y cromatografía en columna. Holt y Stewart  
(Nature 201 (1964) 824) obtuvieron una preparación enzimáti-  
ca de baja pureza por secado por congelación y diálisis de  
caldo de cultivo filtrado. Szentirmai (Acta Microb. Acad.  
Scient. Hung 12 (1966) 395) obtuvo una purificación de 40  
80 veces de enzima de E.coli por precipitación con sulfato de  
amonio, seguida por adsorción sobre gel de fosfato de calcio  
y cromatografía en DEAE-celulosa de un extracto en tampón de  
fosfato de células de E.coli tratadas con ondas ultrasónicas.  
Sakaguchi y Marao (Pat. japonesa nº 26050/64) ob-



384025

85 tuvieron un rendimiento moderado de una preparación enzimática purificada a partir de E.coli extrayendo las células con tampón de borato durante un prolongado período de tiempo o durante un tiempo más corto de combinación con un tratamiento de ondas ultrasónicas. Del extracto, el enzima pudo obtenerse en forma sólida después de precipitación con sulfato amónico, diálisis y secado por congelación. Johnson y Hardcastle (Pat. EE.UU. nº 3297546) obtuvieron una solución de un enzima a partir de E.coli. tratando el cultivo celular con un compuesto  $MX_2$ , usualmente  $Ca(NO_3)_2$  y un compuesto de amonio cuaternario, separando las células por filtración y poniéndolas en suspensión en agua durante algunas horas, y separando luego las células por filtración con tratamiento subsiguiente del filtrado con carbón activo.

100 Se sabe además que los enzimas contenidos en células bacteriales pueden ponerse en libertad por extrusión de suspensiones de células, a alta presión, a través de un pequeño orificio. Duerre y Ribí (Appl. Microbiol. 11 (1964) 467) estudiaron otros tipos de enzimas distintos de las amidasas de penicilina encontradas en E.coli y observaron que 105 había de usarse alta presión, superior a 1.050 kgs/cm<sup>2</sup>. para obtener la máxima liberación de los enzimas. A tales presiones, sin embargo, las paredes de las células se fragmentaban también y se solubilizaba gran parte del material de las células. Frazer (Nature 167 (1951) 33) encontró que las células

384025



110 de E.coli podían romperse en pequeña escala cuando eran expulsadas desde una bomba por una presión de gas de 35-63 kgs./cm<sup>2</sup>.

115 Hemos descubierto ahora que la acilasa de penicilina intracelular en el E.coli puede ser extraída del organismo en agua en escala de gran producción después de que las células, o las suspensiones de las mismas en agua o en una mezcla de agua y disolventes orgánicos, ha sido liberada rápidamente de una presión aplicada de al menos 35 kgm/cm<sup>2</sup>, pero que no excede de la presión a que ocurre una disrupción excesiva de las células.

120

Así, el presente invento, en uno de sus aspectos proporciona un procedimiento para la producción de preparaciones de acilasa de penicilina a partir de E.coli, que comprende una fermentación en una forma conocida de cepas de E.coli productoras de tal enzima, retirar el líquido de cultivo y expulsar rápidamente el material celular a través de un estrecho orificio o hendidura por la aplicación de presión de, al menos, 35 kgs./cm<sup>2</sup> pero que no excede de la presión a que ocurre una disrupción excesiva de las células. Todavía a 125 210 kgs./cm<sup>2</sup>, las células no son rotas en medida excesiva. El material expulsado es luego agitado con agua, eventualmente con adición de un disolvente orgánico y/o una base, como hidróxido sódico o trietilamina, para disolver el enzima.

130

En una realización del presente invento, la retirada



135 da del líquido de cultivo y la expulsión del material celular se efectúan simultáneamente en un separador centrífugo autolimpiador, hecho funcionar a una temperatura entre 0 y 50º, preferiblemente a 15-40º, en que el material celular separado intermitentemente es expulsado al cabo de 0,05-1,0

140 seg., preferiblemente dentro de 0,1-0,5 seg., a través de una hendidura periférica con una anchura de 0,1-1,5 mm., preferiblemente 0,3-0,7 mm., por la aplicación de una presión de 35 a 140 kgs./cm<sup>2</sup>, preferiblemente 63-77 kgs/cm<sup>2</sup>. Si fuera deseable, el caldo es saturado con un disolvente

145 orgánico que tenga poca solubilidad en agua, tal como acetato de butilo, acetato de isobutilo o acetato de amilo, a fin de destruir el organismo y ayudar al proceso que se realiza en el separador. Análogamente, es posible, si fuera deseable, lavar el material celular con agua en el separador.

150 El material celular expulsado es agitado a 10-50º, preferiblemente a 20-40º, durante 0,10-5,0 horas, adecuadamente 0,25-3,0 horas, y más preferiblemente, 0,25-1,0 horas, con un agitador eficaz para disolver el enzima, y posiblemente con adición en una concentración de 1,0-5,0 % de un disolvente orgánico

155 inmiscible con agua, tal como metilisobutil cetona, acetato de butilo, acetato de isobutilo, acetato de amilo, benceno, tolueno o cloroformo. A fin de facilitar la extracción del enzima desde el material celular expulsado, puede añadirse una base inorgánica, tal como hidróxido sódico, hidróxido



160 potásico o amoníaco o una base orgánica terciaria, tal como trietilamina o N-etilpiperidina, a la mezcla, para ajustar y sostener el pH a un valor entre 6,5 y 9,0 preferiblemente entre 7,0 y 8,5.

165 La solución enzimática así obtenida puede, posiblemente después de dilución con agua, ser libertada de cualquier material celular restante y otras impurezas sólidas por procedimientos habituales, tales como filtración o centrifugación, y eventualmente por una combinación de ambos procedimientos y posiblemente con adición de agentes  
170 auxiliares decolorantes, clarificantes, filtrantes, tales como carbón activo, alúmina, polvo de celulosa, tierra de diatomeas u otros agentes sólidos débilmente adsorbentes. Un método preferido es el de eliminar la mayor parte del material celular por centrifugación y filtrar el material  
175 que sobrenada.

Puede obtenerse una purificación adicional del enzima por acidificación de la solución acuosa a pH 3,0-6,0 preferiblemente de 4,0-5,0, separación del material inactivo precipitado por filtración y reajuste del pH al  
180 valor original.

La acilasa de penicilina contenida en las soluciones acuosas exentas de células y, si se desea, parcialmente purificadas, que hemos mencionado, puede precipitarse por tratamiento de las soluciones con agentes, como ta-



185      ninos, que formen complejos escasamente solubles con pro-  
          teínas. En una forma preferida de este proceso, la solución  
          de enzimas es tratada a pH 4-6, adecuadamente a pH 4,5-5,5,  
          con tanino hasta una concentración final de 300-900 ppm en  
190      presencia de agentes de quelación, como ácido etilendiamina  
          tetraacético, que forman complejos con iones de hierro. El  
          complejo enzima-tanino formado puede aislarse de una forma  
          usual, por ejemplo por filtración o centrifugación. Puede  
          lavarse y secarse y libertarse de agua, por ejemplo por se-  
          cado, especialmente por secado por congelación, o por tra-  
195      tamiento con disolventes orgánicos miscibles con agua, como  
          la acetona. El complejo de tanino es una forma adecuada pa-  
          ra almacenar y transportar el enzima. Puede usarse también  
          directamente para la separación de la cadena secundaria de  
          penicilinas, como la bencil-penicilina, como se describe en  
200      la solicitud de patente británica nº 33734/67.

          La acilasa de penicilina contenida en el precipi-  
          tado de tanino puede ponerse en libertad en solución acuo-  
          sa por disolución del complejo en agua a pH 7-9, con prefe-  
          rencia 7,5-8,5. Alternativamente, el complejo puede tratar-  
205      se con una mezcla de agua y un disolvente inmisible con  
          agua, como n-butanol, a pH 4-7, con preferencia 4,5-5,5. Un  
          tercer método de separar el tanino consiste en tratar el com-  
          plejo enzima-tanino, en suspensión en agua con un permutador  
          aniónico, como la DEAE-celulosa, que fija el tanino y pone en

384025<sup>16</sup>



210 libertad el enzima para que pase el agua. Las cantidades de  
agua necesarias para estas operaciones son bastante menores  
que las presentes en las soluciones enzimáticas originales  
y de este modo se consigue una considerable concentración de  
la actividad enzimática.

215 En otro aspecto del invento, la acilasa de penicili-  
lina contenida en cualquier solución a la que se ha hecho re-  
ferencia en lo que antecede puede concentrarse y purificarse  
con ayuda de un permutador iónico, en una forma preferida, el  
enzima es absorbido sobre un permutador catiónico con estruc-  
220 tura abierta, tal como SE-Sephadex (M<sup>2</sup> R<sup>2</sup>), CM-celulosa o CM-  
Sephadex (M<sup>2</sup> R<sup>2</sup>) haciendo pasar la solución del enzima, ajus-  
tada a pH 3,5-6, preferiblemente 4,0-5,0, a través de una co-  
lumna del permutador. Alternativamente, el permutador puede  
ser añadido a la solución de enzima agitada. La acilasa pue-  
225 de ponerse en libertad a partir del permutador iónico por elu-  
ción a pH 6,0-8,0 con soluciones tampón débiles, tales como  
acetato amónico 0,2M o acetato de trishidroximetilamonio.

230 Con el fin de obtener preparaciones más puras del  
enzima, las impurezas iónicas inorgánicas y de bajo peso mo-  
lecular pueden separarse de las soluciones de enzima por dia-  
lización contra agua. Alternativamente, las soluciones, si  
es necesario despues de la concentración por evaporación a  
una temperatura por debajo de 50° hasta una concentración  
adecuada de 25-100 mg. peso seco por ml., se someten a fil-

10  
384025



235 tración por gel.

Las soluciones acuosas de enzima así obtenidas en cualquiera de las etapas anteriores son muy adecuadas para ser usadas directamente para la eliminación de las cadenas laterales de las penicilinas naturales, especialmente para la eliminación de la cadena lateral de bencil-penicilina.

240 En otro aspecto del presente invento, el enzima, tal como ha sido preparado hasta ahora, es aislado de solución acuosa en estado sólido por secado por congelación, secado por flotación, secado por pulverización o concentración en vacío o por precipitación de acuerdo con procedimientos conocidos. El proceso de aislamiento dá como resultado un enzima sólido que posee una elevada actividad específica y que es una forma muy conveniente para almacenaje o transporte. El uso de estas preparaciones enzimáticas sólidas, solubles en agua, tiene asimismo diversas ventajas técnicas, ya que hace posible trabajar con soluciones más concentradas que las utilizadas por los procedimientos conocidos que emplean suspensiones celulares.

255 El método preferido para aislar el enzima consiste en el secado por congelación de una solución de enzima a una temperatura entre -10 y +50º, preferiblemente entre 0 y 30º, o en el secado por flotación de la misma en una corriente de aire a 10 a 55º, preferiblemente 35 a 45º.

Los enzimas y las soluciones de enzima purificados

384025



260 obtenidos de acuerdo con este invento son muy adecuados y  
ventajosos para la producción del ácido 6-amino-penicilánico  
al eliminar la cadena secundaria de penicilinas, espe-  
cialmente de bencil-penicilina los rendimientos y la pure-  
za de los productos son considerablemente mejores que los  
265 obtenidos con los procedimientos conocidos, usando suspen-  
siones de células de E.coli.

La penicilin-acilasa de E.coli puede usarse tam-  
bién para eliminar la cadena lateral de ésteres de penicili-  
na, especialmente de ésteres de bencil-penicilina, como se  
270 describe en la solicitud de patente británica nº 33734/67.  
Hemos descubierto ahora que las preparaciones enzimáticas  
obtenidas de acuerdo con este invento son muy adecuadas pa-  
ra este procedimiento y más eficaces que las suspensiones de  
células de E.coli anteriormente usadas. Hemos descubierto,  
275 además, que las preparaciones enzimáticas de acuerdo con es-  
te invento, son superiores a las suspensiones de células an-  
teriormente usadas en la síntesis enzimática de penicilinas  
a partir de ácido-6-amino-penicilánico y precursor de cade-  
na lateral (W.K. Kaufman y col., Antimicrobial Agents Ann.,  
280 1960, 1).

Las preparaciones enzimáticas purificadas obte-  
nidas de acuerdo con este invento son materiales de parti-  
da adecuados para la modificación química del enzima, dan-  
do como resultado productos con mejores propiedades en lo



285 que respecta a actividad y/o al rendimiento técnico. Así,  
el enzima puede reaccionar con materiales polímeros activa-  
dos, tales como, por ejemplo, polisacáridos tratados con  
bromuro de cianógeno, para dar productos en que el enzima  
queda fijado a un soporte polímero. La actividad enzimática  
290 es retenida en tales productos que son ventajosos en su uso  
para la separación de penicilinas, ya que pueden recuperarse  
de la solución de reacción por medios sencillos, por ejemplo  
por filtración. La preparación de enzima-polímero puede usar  
se también en columnas para la producción continua de 6-APA  
295 haciendo pasar la solución de penicilinas a través de la co-  
lumna.

Ejemplo. Preparación de éster p-nitrobencílico de ácido 6-aminopenicilánico.

Una solución enzimática (18,6 g, actividad 1610  
300 u/g) fue diluída con agua (700 ml) y metanol (120 ml) y ajustada a pH 7,8 por la adición de hidróxido sódico 0,1M. Se añadió una solución de bencil-penicilato de p-nitrobencilo (3,1 g, 6,6 moles) en metanol (60 ml). La mezcla fue agitada a 37° y mantenida a pH 7,8 por adición de hidróxido sódico 0,1M. Después de 2,5 horas, la mezcla fue enfriada y extraída con acetato de etilo (500 ml). La capa ácida fue separada y extraída con una parte adicional de acetato de etilo (250 ml). Las capas orgánicas fueron combinadas y secadas con sulfato sódico anhidro durante 1 hora. Después de filtración, la solución or  
305

384025



310 gánica fue dividida en dos partes iguales. Una de ellas fue  
concentrada en vacío a temperatura ambiente para dar el éster  
p-nitrobencílico de ácido 6-aminopenicilánico, libre,  
en forma de residuo oleoso (1,1 g). El producto, según se  
315 vió, contenía en su espectro de IR bandas a 3250, 1756, 1720  
cm<sup>-1</sup>, mostrando la presencia de un grupo NH<sub>2</sub>, anillo de beta-  
lactama y grupo éster, respectivamente.

A la otra parte de solución de acetato de etilo se  
añadió ácido bencenosulfónico (0,58 g) disuelto en acetona  
(20 ml) y esta parte se concentró luego en vacío hasta un vo-  
320 lumen de unos 30 ml. Al añadir éter (10 ml) y dejar reposar  
durante la noche en la nevera, la sal del ácido bencenosulfó-  
nico de 6-aminopenicilinato de p-nitrobencilo (0,8 g) se de-  
positó en forma de cristales blancos, p. de f. 148-151º, idén-  
tica al producto descrito en la solicitud de patentes británi-  
325 ca nº 33734/67, ejemplo 4.

Esta solicitud, que corresponde a la depositada en  
Inglaterra el día 3 de diciembre de 1968, bajo el núm 57373/68  
se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto  
sobre la Propiedad Industrial y del artículo 4º del Conve-  
330 nio de la Unión.

REIVINDICACIONES  
=====

1).- Un procedimiento para la producción de este-  
res de ácido 6-aminopenicilánico, caracterizado por compren-  
der la degradación enzimática de un éster de penicilina por

h<sub>2</sub>

384025



1972

335 una solución acuosa de una penicilin-acilasa libre de céu  
las obtenida por el metodo reivindicado en la patente prin-  
cipal número 363.592.

2).- Un procedimiento, según la reivindicación 1),  
caracterizado porque el ester de penicilina es bencilpenici-  
340 linato de p-nitrobencilo.

3).- "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ESTE-  
RES DE ACIDO 6-AMINOPENICILANICO"

Esta memoria consta de 15 hojas foliadas y mecano-  
grafiadas por un solo lado de sus caras.

Madrid, 26 de septiembre de 1970

**Pablo Agudo Obregón**

*P. Agudo Obregón*

*104*