

385907



SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>C 12</u>
SUBCLASE <u>1</u>

PATENTE DE INVENCION

Case 970-9611

3700/RA.

Memoria Descriptiva.

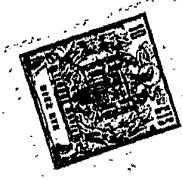
sobre:

PROCEDIMIENTO DE DESDOBLAMIENTO PARA LA PRODUCCION DE
ACIDO 6-AMINOPENICILANICO.

Solicitante: BIOCHEMIE Gesellschaft m.b.H., entidad austriaca,
residente en 4 Kärntnerring, Vienna I, Austria.

5. Esta invención se relaciona con un procedimiento de desdoblamiento para la producción de ácido 6-aminopenicilánico. En particular, la invención se refiere a dicho procedimiento de desdoblamiento que comprende poner en contacto una penicilina con amidasa pe-

**POOR
QUALITY**



nicilínica.

5.

El desdoblamiento de una penicilina mediante contacto con amidasa penicilínica es conocido. Es sabido que cepas de las clases de esquizomicetos (especie del orden Actinomycetales), ficomicetos y ascomicetos son capaces de producir amidasa penicilínica. También es sabido que una cepa de la clase de basidiomicetos, a saber *Pleurotus ostreatus*, perteneciente al orden Hymenomycetales, familia de las poliporáceas, es capaz de producir amidasa penicilínica.

10.

Se ha encontrado ahora sorprendentemente que la cepa *Bovista plumbea*, y variantes y mutantes de la misma, son útiles para la producción de amidasa penicilínica. *Bovista plumbea* pertenece a la familia de licoperdáceas, del orden Gastromycetales, que sistemáticamente se encuentra en una posición en la clase de basidiomicetos completamente diferente a la del único basidiomiceto conocido que produce amidasa penicilínica. Por otra parte, los ensayos con varios cientos de cepas de la clase de basidiomicetos han dado resultados negativos.

15.

20.

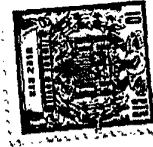
Un cultivo de *Bovista plumbea*, eficaz en la producción de amidasa penicilínica, ha sido depositado en la División de Fermentación de Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Ill., y se le ha asignado la referencia NRRL 3501. Además, también se ha depositado en dichos Laboratorios un cultivo de una variante de dicha cepa y se le ha asignado la referencia NRRL 3824.

25.

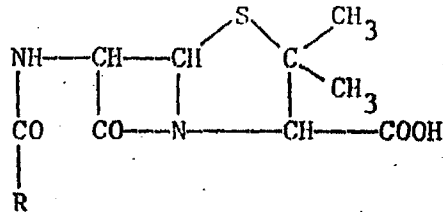
30.

De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento de desdoblamiento para la producción de ácido 6-aminopenicilánico, que comprende poner en contacto

385907



una penicilina de fórmula:



5. en la que R es bencilo, fenoximetilo, fenilmercaptometilo, p-cresoximetilo o n-butoximetilo, o una sal de metal alcalino de dicha penicilina, con amidasa penicilínica producida mediante el cultivo de *Bovista plumbea* (NRRL 3501) o una mutante o variante de la misma, bajo condiciones aeróbicas, en un medio acuoso conteniendo fuentes asimilables de carbono y de nitrógeno.
10. La penicilina empleada en el procedimiento de desdoblamiento preferentemente es fenoximetilpenicilina potásica. La variante NRRL 3824 de *Bovista plumbea* (NRRL 3501) puede emplearse para producir la amidasa penicilínica.
15. La penicilina puede ponerse en contacto con micelio conteniendo amidasa penicilínica, producido mediante dicho cultivo. Además, la penicilina puede ponerse en contacto con amidasa penicilínica que ha sido separada del medio que la acompaña. Tal amidasa penicilínica separada
20. puede mezclarse convenientemente con un soporte inerte y puede dársele la forma de un granulado. Las partículas de dicho micelio conteniendo amidasa penicilínica o de dicho granulado pueden revestirse con una película permeable de material polimérico. El material polimérico puede ser resina de ácido poliacrílico.
- 25.

El soporte inerte para la amidasa penicilínica



5. puede ser, por ejemplo, carbonato de calcio, tierra de diatomeas, arena de mar o similares. Las partículas revestidas del micelio o del granulado pueden emplearse, por ejemplo para el procedimiento de desdoblamiento cargando una columna con dichas partículas o granulado revestido, y pasando una solución de la penicilina a través de la columna. Sin embargo, las partículas revestidas del micelio o del granulado también pueden emplearse en los procedimientos "batch" convencionales, por ejemplo en un tanque de fermentación.

10. Deberá tenerse presente, sin embargo, que la amidasa penicilínica producida mediante dicho cultivo puede estar contenida en preparaciones con cualquier forma conveniente.

15. El procedimiento de desdoblamiento de la invención puede efectuarse, por ejemplo, después de un período preliminar de fermentación, por ejemplo una vez finalizada la fase de crecimiento. Puede añadirse una solución de la penicilina al medio de cultivo mismo y dejarse que continúe la fermentación. Semejantemente, puede añadirse la solución de la penicilina a un filtrado del cultivo, o a una suspensión del micelio que ha sido separado del cultivo, y suspenderse en un soporte libre de sustancias nutritivas, por ejemplo agua, una solución de sal común o una solución reguladora. De acuerdo con esta variante del procedimiento de desdoblamiento, el contacto íntimo de la penicilina con la amidasa penicilínica puede realizarse sacudiendo juntamente la solución de la penicilina y la preparación particular conteniendo amidasa penicilínica, bajo condiciones aeróbicas.

20.

25.

30.



- La concentración mas conveniente de la solución de penicilina empleada en las diversas variantes arriba descritas del procedimiento de desdoblamiento dependerá naturalmente en gran parte de la actividad o concentración de la amidasa penicilínica. Sin embargo, se prefiere que el desdoblamiento quede finalizado en el transcurso de unas cuantas horas o, a lo más, en el transcurso de aproximadamente dos días. El pH del sistema preferentemente es aproximadamente neutro, pero el desdoblamiento también prosigue satisfactoriamente bajo condiciones débilmente ácidas o débilmente alcalinas. La amidasa penicilínica se emplea preferentemente hasta su plena capacidad con el fin de evitar la destrucción de la penicilina o del ácido 6-aminopenicilánico resultante.
- 5.
- 10.
15. El ácido 6-aminopenicilánico producido de acuerdo con la invención puede emplearse en forma convencional y conocida para la producción de penicilinas semi-sintéticas. Así, por ejemplo, las penicilinas semi-sintéticas pueden producirse directamente, con o sin aislamiento o concentración del ácido 6-aminopenicilánico obtenido, con el fin de producir penicilinas conocidas en forma semi-sintética. Así, el grupo 6-amino del ácido 6-aminopenicilánico obtenido puede acilarse en forma convencional para obtener diversas penicilinas semi-sintéticas.
- 20.
25. Las formas particulares para llevar a cabo el procedimiento de desdoblamiento de la invención se describen, a modo de ejemplo solamente, en los Ejemplos siguientes.
- EJEMPLO 1:
30. El micelio de un cultivo primario de Bovista



5. plumbea (NRRL 3501), incubado a 24° C durante 14 días (medio nutritivo: agar dextrosa Sabouraud, llenado en tubos de ensayo de 16 x 160 mm con un contenido de 5 cc, se deja solidificar en posición oblicua) se lava con 5 cc de la solución nutritiva indicada a continuación, se desmenuza con una varilla de vidrio en un tubo de ensayo estéril y se transfiere a un matraz de Erlenmeyer de cuello angosto llenado con 20 cc de la solución nutritiva estéril indicada a continuación.

10. Solución nutritiva:

1 g de nitrógeno (en forma de levadura de cerveza autolizada filtrada)

50 g de glucosa

1 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$

15. 0,5 g de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

0,5 g de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$

0,1 g de ClNa

0,05 g de $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

se llena hasta 1000 cc con agua destilada

20. pH 6,0.

Después de llenar el matraz con la solución nutritiva, se añaden 0,6 % de aceite de esperma. La solución nutritiva se esteriliza a 120° C en un autoclave de vapor durante 40 minutos y después de la incubación, se sacude a 24° C durante 96 horas en una máquina agitadora rotatoria con una embolada de 40 mm y 260 revoluciones por minuto. El micelio de esta primera etapa sumergida es esférico, y todo el cultivo se tritura hasta una consistencia de papilla en un tubo de vidrio de tamaño apropiado con un majadero de vidrio bien encajado, bajo

25.

30.

385907

- 7 -



- condiciones estériles. 10 cc de este cultivo triturado se usan para la inoculación de la segunda etapa sumergida (matraz de Erlenmeyer de cuello ancho y una capacidad de 500 cc., llenado con 100 cc de la solución nutritiva arriba indicada). Se sacude a 24° C durante 96 horas sobre una máquina agitadora rotatoria con una embolada de 40 mm y 260 revoluciones por minuto, y el cultivo se homogeniza luego con un mezclador de inmersión adecuado bajo condiciones estériles durante 3 segundos a 4000 a 4500 revoluciones por minuto. Con este fin la cabeza de dispersión del mezclador, que ha sido esterilizada a 120° C en un autoclave de vapor durante 30 minutos, se introduce en el recipiente de cultivo que ha sido abierto bajo condiciones estériles y mientras se mantiene el mismo en posición horizontal. 10 cc del producto homogenizado de esta segunda etapa sumergida se usan para la inoculación de un recipiente de cultivo de la tercera etapa sumergida (matraz de Erlenmeyer de cuello ancho con capacidad de 500 cc, que ha sido llenado con 100 cc de la solución nutritiva arriba indicada). Se sacude a 24° C durante 96 horas y se homogeniza bajo condiciones análogas a las de la segunda etapa sumergida. El desdoblamiento de la penicilina se efectúa en matraces de Erlenmeyer con capacidad de 500 cc, llenados con cantidades de 45 cc de la solución nutritiva estéril arriba indicada, efectuándose la inoculación con cantidades de 10 % de la tercera etapa sumergida arriba descrita. Después de sacudir a 24° C durante 96 horas sobre una máquina agitadora rotatoria con una embolada de 40 mm y 260 revoluciones por minuto, se añaden 30.000 unidades de fenoximetilpenicilina potásica en forma sólida por cada
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.
 - 30.



cc de contenido del matraz. A intervalos de 3 a 6 horas se examinan pequeñas porciones del contenido del matraz con el fin de determinar la penicilina residual o el ácido 6-aminopenicilánico resultante. Después de la extracción de la penicilina, se determina la proporción de concentración del sustrato : concentración del producto de desdoblamiento por medio de la yodometría. Después de 8 horas se ha desdoblado el 94 % de la penicilina usada y se halla presente en forma de ácido 6-aminopenicilánico.

5.

10.

EJEMPLO 2:

Tanques para cultivo sumergido, de acero inoxidable, provistos de aparatos para aeración y agitación y llenados con 5 litros de la solución nutritiva descrita en el Ejemplo 1, se inoculan con el material de inoculación obtenido en la forma descrita en el Ejemplo 1. Después de un período de fermentación de 96 horas, el micelio resultante se separa de la solución de cultivo, se lava y se suspende en 2 litros de una solución reguladora de fosfato 0,15 molar con un valor pH de 7,5, después de lo cual se añaden en porciones 100.000 unidades de fenoximetilpenicilina potásica por cada cc de masa de cultivo. Durante el desdoblamiento el valor pH se mantiene automáticamente al valor inicial. Después de agitar y de aerar durante 27 horas se ha desdoblado el 90 % de la penicilina usada.

15.

20.

25.

EJEMPLO 3:

30 cc de barniz de revestimiento de resina poliacrílica (Eudragit^R retard-s) se añaden a 40 g. de micelio de Bovista plumbea (NRRL 3501) conteniendo amidasa penicilínica y que ha sido secado mediante tratamiento con

30.



acetona, y esto se forma en una masa plástica mientras se evapora el disolvente y se amasa continuamente. Poco antes de endurecerse completamente la masa, ésta se estruja a través de un tamiz de nylon con un diámetro interior de la malla de 750 μ . Se obtiene un micelio de forma estable y con suficiente solidez mecánica para llenar uniformemente una columna. 35 g. de este micelio formado y revestido se suspenden en 500 cc de una solución reguladora de fosfato según Sörensen, con un pH de 7,5, y con esta suspensión se llena una columna de vidrio (2,5 x 50 cm) provista de una camisa de calentamiento. La columna cargada, con una altura de carga de aprox. 33 cm y un volumen de aprox. 162 cc, se lava a temperatura ambiente con solución reguladora de fosfato según Sörensen, con un pH de 7,5, a una velocidad por volumen de 0,5 durante 4 a 5 horas. El desdoblamiento se efectúa por la adición continua de aprox. 40.000 unidades de fenoximetil-penicilina potásica por cc, en una solución reguladora de fosfato con un pH de 7,5, conteniendo 40 g. de $PO_4Na_2H \cdot 12 H_2O$ y 2,5 g. de PO_4H_2K por litro, a la columna que ha sido calentada hasta 28° C mediante una bomba. La velocidad por volumen asciende a 0,3 a 0,35. Los resultados obtenidos con un ensayo continuo se indican en la Tabla siguiente:

Tiempo transcurrido (horas)	Concentración del sustrato (unidades/cc)	Acido 6-amino-penicilánico formado (unidades/cc)	Penicilina residual (unidades/cc)	Rendimiento del desdoblamiento (%)
8	40150	36280	2100	90,4
16	39210	36430	1860	92,9
32	41200	36710	2800	89,1
40	40030	35870	3050	89,6



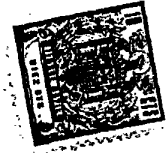
Tiempo transcurrido (horas)	Concentración del sustrato (unidades/cc)	Acido 6-amino-penicilánico formado (unidades/cc)	Penicilina residual (unidades/cc)	Rendimiento del desdoblamiento (%)
56	38950	35200	1600	90,4
64	40800	35910	2100	88,1
80	39750	36240	2050	91,2
88	40800	34810	3700	85,3
152	40150	35350	3100	88,4
248	40050	36300	2750	90,6

La alta capacidad de desdoblamiento es mantenida aún después de 20 días de operación continua. El ácido 6-aminopenicilánico puede aislarse en forma pura de las soluciones de desdoblamiento casi incoloras de acuerdo con los métodos usuales.

EJEMPLO 4:

2,5 cc de un extracto de enzimas, altamente concentrado, de 23 g. de micelio de *Bovista plumbea* (NRRL 3501) que ha sido secado con acetona, se mezclan con 4,5 g. de Filter Cel (tierra de diatomeas). El adsorbato se lava 3 veces con cantidades de 50 cc de acetona fría, se seca, se le añaden 9 cc de barniz de revestimiento de resina poliacrílica (Eudragit^R retard-s), esto se forma en una masa plástica y se estruja a través de un tamiz de nylon con un diámetro interior de la malla de 500 μ . El granulado solidificado se suspende en una solución reguladora de fosfato según Sørensen, con un pH de 7,5, y con esta suspensión se llena una columna de vidrio (1,0 x 30 cm), provista de una camisa de calentamiento. La altura de carga es de 25 cm. Después de lavar durante un corto período con una solución reguladora de fosfato con un valor pH de 7,5,

5.
10.
15.
20.



5.

se le añade a la columna una solución de aprox. 20.000 unidades de fenoximetil-penicilina potásica por cc, en una solución reguladora de fosfato con un pH de 7,5 y conteniendo 40 g. de $PO_4Na_2H \cdot 12 H_2O$ y 2,5 g. de PO_4H_2K por litro, a una velocidad por volumen de 0,2. Simultáneamente se calienta la columna hasta 28° C. Los resultados del ensayo de desdoblamiento se indican en la Tabla siguiente:

Tiempo transcurrido (horas)	Concentración del sustrato (unidades/cc)	Acido 6-amino-penicilánico formado (unidades/cc)	Penicilina residual (unidades/cc)	Rendimiento del desdoblamiento (%)
2	20500	15060	3200	73,4
8	19630	16370	2050	83,4
20	19700	16830	2100	85,5
48	19150	15600	2500	81,5
50	20850	17050	2000	81,5
72	19400	16300	2450	83,0

10.

La solución de desdoblamiento resultante es incolora, y el ácido 6-aminopenicilánico aislado de la misma indica un punto de descomposición de 206-208° C (sin corregir) y una actividad de 2740 unidades/mg (yodométrica).

EJEMPLO 5:

15.

Se produce un litro de un cultivo sumergido de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, a partir de un cultivo primario de Bovista plumbea NRRL 3824, la que es una variante o mutante de Bovista plumbea NRRL 3501. Con el material de inoculación resultante se inocula un tanque de cultivo sumergido, provisto de aparatos de agitación y aeración y llenado con 5 litros de la so-

20.



5.

lución nutritiva descrita en el Ejemplo 1. Después de un período de fermentación de 72 horas, el micelio resultante se separa de la solución de cultivo, se lava y se suspende en 3,5 litros de una solución reguladora de fosfato 0,15 molar con un valor pH de 7,5, después de lo cual se añaden en porciones 60.000 unidades de fenoximetil-penicilina potásica por cada cc de masa de cultivo. Durante el desdoblamiento el valor pH se mantiene automáticamente a 7,5. Después de agitar y de aerar durante 10 horas, se ha desdoblado el 92 % de la penicilina usada.

10.

EJEMPLO 6:

60.000 unidades de fenoximetil-penicilina potásica por cada cc de licor de cultivo se añaden en porciones a la solución de cultivo obtenida después de separar el micelio obtenido de acuerdo con el Ejemplo 5. Durante el desdoblamiento se mantiene el valor pH automáticamente a 7,5. Después de 8 horas, el 85 % de la penicilina usada se halla presente en forma de ácido 6-aminopenicilánico.

15.

EJEMPLO 7:

Cuando se sigue el procedimiento del Ejemplo 1 y se usan las otras penicilinas indicadas en la descripción en lugar de fenoximetil-penicilina potásica, se obtienen los resultados siguientes:

20.

Penicilinas	Cantidad (unidades/cc)	Período de desdoblamiento (horas)	Desdoblamiento (%)
Bencil-penicilina	30.000	8	1
Fenilmercaptometil-penicilina	30.000	8	1
p-Cresoximetil-penicilina	30.000	8	31
n-Butoximetil-penicilina	30.000	7	92



EJEMPLO 8:

5. Un tanque de cultivo sumergido, de acero V4A, provisto de aparatos de agitación y aeración y conteniendo 5 litros de la solución nutritiva descrita en el Ejemplo 1, se inocula con 0,5 litros de un cultivo sumergido de Bovista plumbea NRRL 3501, producido en la forma descrita en el Ejemplo 1. Después de un período de fermentación de 96 horas, se filtra la masa de cultivo y se ajusta el pH del filtrado de cultivo a aproximadamente 6 mediante la cuidadosa adición de ácido sulfúrico al 20 %.
10. Luego se añaden 30 g. de aerogel de sílice a 3 litros del filtrado, éste se agita a temperatura ambiente durante 40 minutos y se centrifuga. El aceite que ha sido separado mediante la centrifuga y que ha adsorbido la enzima de desdoblamiento, se lava tres veces, cada vez con un litro de solución reguladora de fosfato según Sörensen con un pH de 7,5, se suspende en 1,5 litros de agua destilada y se añaden 45 g. de fenoximetilpenicilina potásica. El desdoblamiento enzimático del sustrato se efectúa a 28° C mientras se agita y se añade amoníaco concentrado con el fin de mantener el valor pH a aproximadamente 7,5. Después de un período de desdoblamiento de 6 horas, se ha desdoblado aproximadamente 84 % de la penicilina usada.

N O T A

25. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud
- 30.

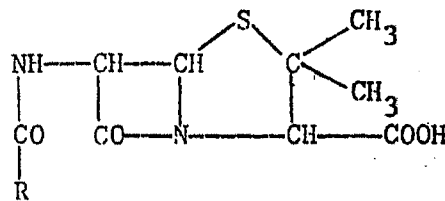


de Patente, presentada en Austria, con fecha 28 de noviembre de 1969, bajo el número 11148/69; acogiendo por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO DE DESDOBLAMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO 6-AMINOPENICILANICO; caracterizándose por lo siguiente:

5.

10.

1.- Procedimiento de desdoblamiento para la producción de ácido 6-aminopenicilánico, caracterizado porque comprende poner en contacto una penicilina de fórmula:



15.

20.

en la que R es bencilo, fenoximetilo, fenilmercaptometilo, p-cresoximetilo o n-butoximetilo, o una sal de metal alcalino de dicha penicilina, con amidasa penicilínica producida mediante cultivo bajo condiciones aeróbicas de *Bovista plumbea* (NRRL 3501) o una mutante o variante de la misma, en un medio acuoso conteniendo fuentes asimilables de carbono y de nitrógeno.

25.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende poner en contacto fenoximetil-penicilina potásica con amidasa penicilínica producida mediante el cultivo de *Bovista plumbea* (NRRL 3501) o una mutante o variante de la misma, en un medio acuoso conteniendo fuentes asimilables de carbono y de nitrógeno.



385907

no.

5. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, ó 2, caracterizado porque la penicilina se pone en contacto con amidasa penicilínica producida mediante el cultivo de la variante NRRL 3824 de Bovista Plumbea (NRRL 3501), en un medio acuoso conteniendo fuentes asimilables de carbono y de nitrógeno.
10. 4.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la penicilina se pone en contacto con micelio conteniendo amidasa penicilínica y formado mediante dicho cultivo.
15. 5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque la penicilina se pone en contacto con partículas de micelio conteniendo amidasa penicilínica, habiéndose revestido dichas partículas con una película permeable de material polimérico.
20. 6.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la amidasa penicilínica se separa del medio que la acompaña, se combina con un soporte inerte y se conforma en un granulado.
25. 7.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque el granulado se reviste con una película permeable de material polimérico.
30. 8.- Procedimiento de desdoblamiento para la producción de ácido 6-aminopenicilánico, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.
- Esta Memoria consta de 15 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 30 MAYO 1973

BIOCHEMIE Gesellschaft m.b.H.

L. GOMEZ ACEBO Y MODEX

p. Firmador L. Gaita Fernández