

389257

15M



SECCION TECNICA	
CLASIFICACION I. P. C.	
CLASE <u>E13</u>	<u>A61</u>
SUBCLASE <u>D</u>	<u>K</u>

P A T E N T E

D E

I N T R O D U C C I O N

por "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE DERIVADOS DE PENICILINA", a favor de D^{ña}. Carmen NOGUEIRA CALVO, de nacionalidad española residente en BARCELONA, -Pje, de la Concepción 14, 2^a, 2^a

= , =

MEMORIA DESCRIPTIVA

En la presente patente de introducción, se describe un procedimiento para la obtención de derivados de Penicilina. En particular se refiere al desarrollo sobre el procedimiento y método de preparación de α -amino bencilpenicilina o p-amino-bencil penicilina. Este método de preparación de los antedichos compuestos está basado particularmente en una reacción de tipo enzimático.

5.

Los compuestos obtenidos así, como los dos α -amino bencil penicilina y p-aminobenzilpenicilina son de gran

389257

15.



aplicación en medicina.

5. Los resultados obtenidos a través de esta invención de procedimiento de obtención nos permiten disponer de α -Aminobencil penicilina y p-Aminobencil penicilina, siendo este procedimiento fácil de realizar al mismo tiempo que nos proporciona a través de esta reacción enzimática un elevado rendimiento de los productos finales deseados.

10. Por este método el α -amino bencilpenicilina, empleando un medio de cultivo apropiado con los microorganismos necesarios se llega a separar por medio enzimático el 6-amino-penicilánico, el cual se puede extraer del medio de cultivo o un derivado de penicilina o cualquier otro derivado que se desee emplear.

15. Se da por conocido que el p-amino-bencil-penicilina puede obtenerse a partir de 6 APA o de un derivado de penicilina y p-amino-fenilacetato.

20. La obtención de α -Aminobencilpenicilina y p-Aminobencilpenicilina, se obtiene haciendo reaccionar en un caldo de cultivo apropiado, conteniendo una disolución enzimática, compuesta por diversos microorganismos, el 6-APA u otro derivado de penicilina, con α ó p-amino-fenilacetato.

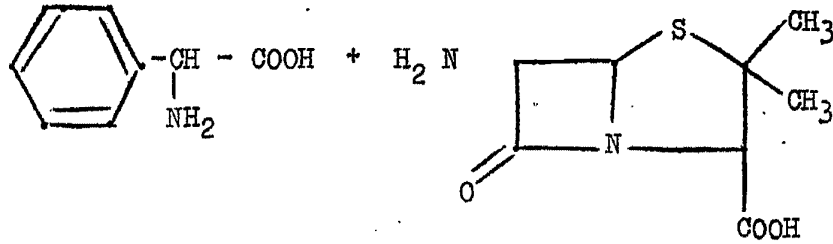
El desarrollo enzimático de la reacción transcurre según los esquemas siguientes:

389257



1.- Obtención de α -Aminobencilpenicilina empleando como substrato 6. APA.

5.

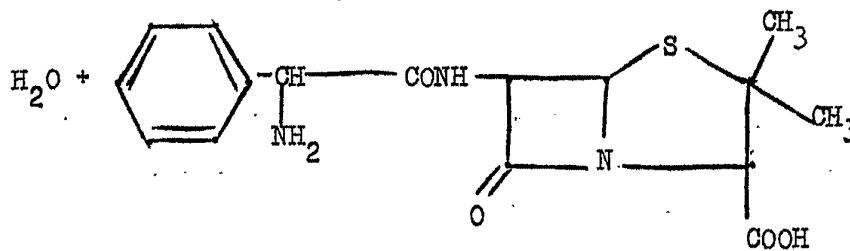


(en forma de α -amino
fenilacetato)

ac-6-amino penicilánico (6-APA)



10.



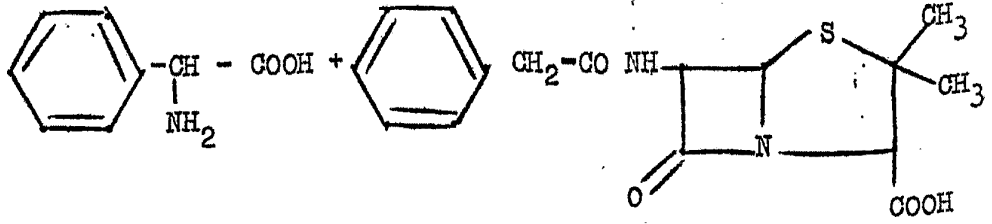
α -amino-bencilpenicilina

15.

Utilizando Penicilina G, como substrato la reacción trans-
ocurre según el siguiente mecanismo:

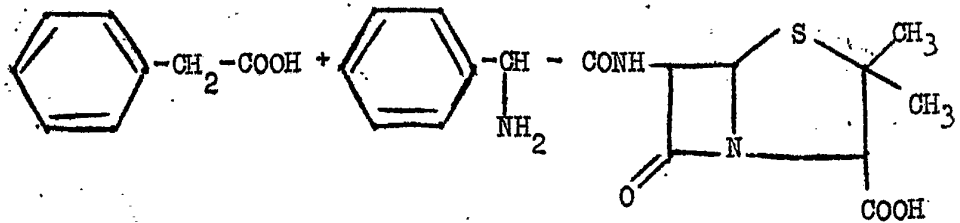
389257

15 MAR 1971



5. (en forma de α -aminofenilacetato)

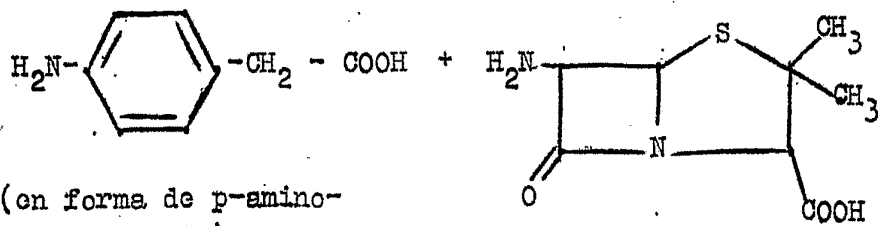
Penicilina G



10. (en forma de fenilacetato)

α -amino-bencil-penicilina

2.-Obtención de p-Aminobencilpenicilina empleando 6 APA, como sustrato:

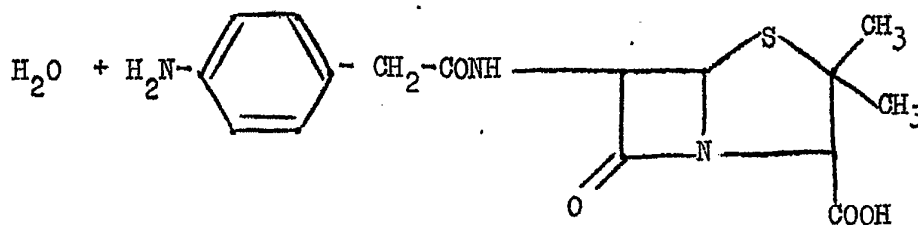


15. (en forma de p-amino-fenilacetato)

ácido 6-amino penicilánico (6 APA)

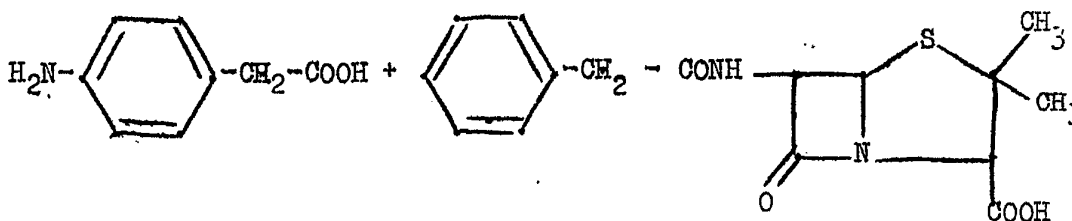
389257

15 MAR 1950



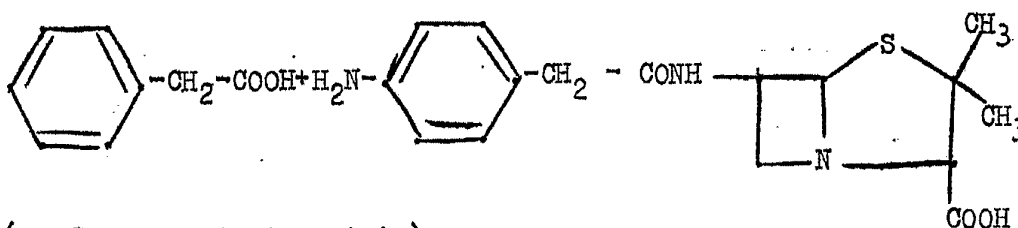
p-amino-bencil penicilina

Cuando el substrato empleado es penicilina G, la reacción se verifica según el siguiente mecanismo:



(en forma de p-amino fenilacetato)

Penicilina G



(en forma de fenilacetato)

p-aminobencilpenicilina

389257



- Otros microorganismos preferidos, son aquellos que asimilan hidrocarburos como, los microorganismos del Genera Pseudomonas, y pertenecen a los mismos: Arthrobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, Micrococcus, Mycobacterium, Nocardia, Kluyvera, Rhodopseudomas, Streptomyces. Se prevee asimismo, extremos de mutación que poseen enzimas. Estos mutantes que tienen un contenido de enzimas semejantes con un efecto fuerte, mediante un tratamiento con rayos X o ultravioleta, ocasionan una mutación genética con un valor químico semejante.
- 5.
- 10.

- Quizás en un medio de cultivo sintético, o natural puede adaptarse la creación de tal estirpe que regule los resultados, obteniendo un aumento de productividad. Esta clase de productos es conocida. Se trata por ejemplo de una fuente de carbonos, una de nitrógenos con uniones inorgánicas parecidas.
- 15.

Estos materiales se utilizan en cantidades equivalentes a la cantidad de microorganismos.

- Como fuente de carbonos las preferidas son: por ej. glucosa, fructosa, maltosa, azúcar natural, almidón, almidón soluble, melazas y sorbitol. Además de estos, se pueden usar ácidos orgánicos como: ácido acético, y ácido láctico como otros parecidos. Estas sustancias se pueden emplear
- 20.

389257

15 MAR



- solas o mezcladas con otras. Para el empleo de hidrocarburos que puedan ser asimilados por microorganismos pueden ser por ej. n-parafinas, ingredientes de aceite crudo, queroseno, aceites ligeros, o aceites pesados en un medio aditivo como fuente principal de carbonos.
- 5.

- Moléculas o sales nitrogenadas hay varias por ej. urea, amoníaco líquido, sales amónicas como cloruro amónico, fosfato amónico y otros parecidos. Substancias naturales como, agua de maíz, extractos de carne, harina de pescado, extracto de levadura Peptona, caseina hidratada, caseina ácida, extracto de arroz y otros. Estas substancias pueden emplearse solas o combinadas con otras.
- 10.

Moléculas o sales inorgánicas con valor elevado que pueden emplearse solas o combinadas con otras.

15. Moléculas o sales inorgánicas con valor elevado que pueden emplearse son: sulfato de magnesio, fosfato de sodio, fosfato monoácido de potasio, monofosfato de potasio.

- Las enzimas se pueden cultivar de dos maneras, una en forma de líquido que al separar las células microorgánicas se forma precipitado y otra en solución de enzimas utilizando métodos conocidos apropiados para purificar las substancias, p. ej: los medios salinos como sulfato amónico por diálisis, o formando un precipitado con acetona o etanol,
- 20.

389257

15



como también por cromatografía en columna. En caso de que se empleen células microorgánicas se hará en forma de suspensiones o en forma de célula seca (un secado de células se puede hacer con acetona).

5. Si se emplea un cultivo en líquido se añadirá sustrato de penicilina o semejante en el líquido cultivado. La reacción se llevará a cabo teniendo en cuenta que el pH sea de 6,5 - 7,0.

10. Como ya mencionamos se empleará por ejemplo penicilina G y penicilina V en sustrato o 6 APA. Estas moléculas se usan normalmente en sus sales de potasio o sodio. Otras formas de empleo son, sales sustratos de potasio, -sodio-, de α -aminofenilacético y p-aminofenilacético. También se pueden emplear derivados de estas moléculas como amidas, éster de metilo, éster de etilo, éster ácido de tioglicol, etc.
- 15.

20. En general la reacción se hace en líquido añadiendo dos sustratos y la cantidad de enzimas equivalentes colocando el valor pH previamente. Además se puede hacer la reacción en líquido que fermenta. En este líquido de fermentación se añaden los dos sustratos. El valor de pH de 6,3 - 7,3. Temperatura 35° - 38°C. Tiempo de 1-24 horas de duración. Al terminar la reacción se obtienen α -aminobencilpenicilina o p-aminobencilpenicilina. La extracción se

389257



hace llevando los líquidos orgánicos a su punto isoeléctrico, por cromatografía en columna apropiada, con intercambiador de iones.

Ejemplo 1º

5. Como microorganismos inoculadores se emplean pseudomonas sp AT00 21284. En un erlenmeyer de 250 ml. se añaden 20 ml. de un cultivo inoculador y una cinta de platino. Ese cultivo inoculador contiene 1% peptona, 1% extracto de carne, 0,5 extracto de levadura y 0,3% cloruro sódico. La prueba se hace a 30°C con fuerte agitación durante 24 horas.
10. Dos ml. del caldo de cultivo inoculador obtenido se echan en el erlenmeyer al que anteriormente se le habían añadido 20 ml de sustancias fermentadoras con la siguiente composición: sulfato de hierro, cloruro magnésico, cloruro cálcico, cloruro sódico y sulfato de zinc.
- 15.

Las reacciones se llevan a cabo bajo temperaturas moderadas de 20º-50ºC. agitándolas, el valor pH será de 5,0 - 9,0 tiempo que dura la reacción de 1-7 días. Las enzimas que sean apropiadas para tal reacción se sintetizarán en las células de los microorganismos, durante el cultivo de tales.

- 20.
- 0,5% = Peptona
 - 0,5% = Extracto de levadura
 - 2,5% = Agua de maíz

389257



0,3% = Cloruro sódico

0,5% = L-glutamato sódico

El valor pH antes de la esterilización debe ser 7,3.
Si es más bajo el pH de 5 se añade n - NaOH.

5. Después del proceso que dura 48 horas con fuerte agitación a 30°C, de temperatura, las células microorgánicas recogidas del caldo de fermentación se centrifugan en solución de cloruro sódico 0,9% dos veces. A continuación se hará una suspensión de células en tampón fosfato 1/30 molar con un pH de 6,8 en cantidades de 10 mg/ml refiriéndose a las células secas suspendidas.
- 10.

A continuación se añaden 1,5 mg/ml de ácido 6-Aminopenicilánico y 10 mg/ml de α -aminofenilacetato potásico. A continuación se deja reaccionar la solución durante 40 horas a 37°C.

15.

La cantidad de α -Aminobencilpenicilina que se origina durante la reacción es de 1,53 mg/ml.

Ejemplo 2º.

20. Kluyvera citrophila ATCC 21285 se empleará como microorganismo inculador. Las condiciones del desarrollo son como el primer ejemplo. Con excepción, de que se añadió 0,2% de fenilacetato amónico como producto medio primario.

389257

15



5. ciplal. Las células microorgánicas se recojen después de las 48 horas de desarrollo, siguiendo el mismo proceso que en el ejemplo 1º con la excepción de que se agregaron 0,6 mg/ml de ácido 6-Aminopenicilánico después de 3 horas de reacción. Después de añadir 6 APA se continua durante una hora. La cantidad que se obtiene de α -Aminobenzylpenicilina fue de 2,38 mg/ml.

Ejemplo 3º

10. Se emplearon los mismos microorganismos inoculadores que en el ej. 2. Además las mismas condiciones durante el desarrollo. De todos modos se añadieron 3 mg/ml de sales potásicas de penicilina G en la reacción en vez de añadir ácido 6-aminopenicilánico (como ej. 1º). Además se añadieron en la reacción 10 mg/ml α -Aminophenylacetamida
15. en vez de la sal potásica del α -aminophenylacético. Las reacciones son como en el ej. 1º. Después de cinco horas de desarrollo se forman 2,52 mg/ml de α -Aminobenzylpenicilin.

Ejemplo 4º.

20. Rhodopseudomonas shperoides ATCC-21286 y Micrococcus ureae ATCC 21288 se emplearon, como medio de inoculación. Los demás componentes son los mismos que en el ej. 1. Después de 48 horas se agregaron ácido 6-Aminopenicilánico y α -Amino-fenilacetato de etilo, al caldo de fer-

389257

15



5. mentación, en la cantidad de 1,5 mg/ml o también 10 mg/ml, sin que para ello se separasen las células de los organismos. El pH del líquido de cultivo se ajustó a 7,1, se dejó la reacción, cuidando mantener el pH del líquido de fermentación siempre constante en 7,1, añadiendo ácido clorhídrico o sosa en caso necesario, este control se realiza cada media hora.

10. La cantidad determinada en el líquido de fermentación de α -aminobencilpenicilina después de cinco horas de reacción fué, de 1,20 mg/ml con el substrato de *Rhodopseudomonas spheroides* y de 1,08 mg/ml con el substrato de *Micrococcus ureae*.

Ejemplo 5º.

15. *Streptomyces phaeochromogenes* ATCC 21289 y *Nocardia globerula* ATCC 212922 se emplearon como inoculadores. Al líquido de fermentación se añadieron:

- 3% de almidón soluble
- 2% de harina de soja
- 0,2% de Cloruro sódico
- 20. 0,5% de extracto de levadura
- 0,5% de Peptona

El medio fue controlado con un pH 7,3 antes de la esterilización, las restantes operaciones fueron las mismas

389257

15M



que las descritas en el ej. 1.

Después de 4 días, se añadieron al líquido de fermentación 25 mg/ml de Penicilina V en el caso de Streptomyces Phacocromogenes y 25 mg/ml de Penicilina G en el caso de Nocardia globerula, junto con 10 mg/ml de ester metílico del ácido α -amino fenilacético. El pH del líquido de fermentación se ajustó a 6,8, se controla cada 30 minutos ajustándole a 6,8 con clorhídrico o sosa cuando fuera necesario.

10. La cantidad determinada de α -Aminobencilpenicilina en el líquido de fermentación después de seis horas empleando como substrato Streptomyces phacochromogenes fué de 1,27 mg/ml. En el caso de Nocardia globerula se determinaron 2,04 mg/ml de α -aminobencil penicilina en el líquido de fermentación.

15.

Ejemplo 6º.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15246 se emplearon como microorganismo de inoculación. El medio de cultivo contiene 1% Peptona, 1% Extracto de carne, 0,5% Extracto de levadura y 0,25% de Cloruro sódico. En un erlenmeyer de 250 cc. que contenía 20 cc. de líquido de fermentación se colocó una lámina de platino con los microorganismos de inoculación. El fermento se agitó en medio aerobio a 30°C. de vez en cuando durante 24 horas.

20.

389257

15



2 ml. de contenido líquido de cultivo se añadieron a un balón de 250 cc. de capacidad que contenía 20 ml. de líquido de fermentación, como prueba se pusieron juntos:

- 5. 5% de n-parafinas (mezcla de parafinas $C_{11}-C_{14}$ en igual cantidad).
- 6,3% de fenilacetato
- 2% de $(NH_4)_2 SO_4$
- 0,15% $KH_2 PO_4$
- 0,05% $Mg SO_4 \cdot 7 H_2O$
- 10. 0,001% $Mn SO_4 \cdot 4H_2O$
- 0,01% $Fe SO_4 \cdot 7 H_2O$
- 0,5% Extracto de levadura
- 0,2% Agua de maíz
- 2% $Ca CO_3$

- 15. El pH del medio antes de esterilizar se ajustó a 7,3. Después la fermentación permaneció durante 72 horas a 30°C bajo una agitación aerobia del cultivo, se separaron las células de microorganismos del líquido de cultivo por centrifugación, se lavó dos veces con una solución de cloruro sódico al 0,9% y se añadieron las células secas en 20. una solución tamponada de fosfato 1/30 molar a un pH 6,9 en una proporción de 8 mg/ml). (células secas).

Se agregaron a la solución 25 mg/ml de ácido 6-amino penicilánico y 10 mg/ml de ester metílico del ácido

389257

15



α -amino fénilacético. La reacción se dejó a 37°C durante 5 horas. La cantidad obtenida en la disolución de α -aminobencilpenicilina fue de 3,05 mg/ml.

Ejemplo 7º

5. *Brevibacterium cerinus* ATCC 15112, fué empleado como cepa de microorganismos, los tratamientos realizados fueron iguales que los descritos en el ejemplo 6. La solución reaccionante fue mezclada con 10 mg/ml de p-amino-fenil-acetato en forma de metil ester. Los demás compuestos de reacción
10. fueron iguales que los descritos en el ejemplo 6. Después de 4 horas de reacción, una muestra de la disolución extraída nos dió una proporción de p-Amino-bencil-penicilina de 3,82 mg/ml.

Ejemplo 8º

15. *Arthrobacter simplex* ATCC 15799 fue empleada como cepa de microorganismos, fue realizado en igual medio de cultivo que en el ejemplo 6, se agregaron un 7,1% de queroseno de una mezcla de parafinas normales con ello se separó el fenilacetato. Los otros componentes de la reacción fueron
20. iguales que en el ejemplo 6.

Después de 72 horas se añadió al cultivo 2 mg/ml de ácido 6-aminopenicilánico y 10 mg/ml de α -aminofenilacetamida, sin variar el líquido de fermentación y sin separación

389257



- de células. El pH del líquido de fermentación es de 6,5, que es lo necesario para el cultivo. Cuando el cultivo altera el pH del líquido de fermentación, este se equilibra con ácido clorhídrico o hidróxido sódico, este control se realiza cada 30 minutos. Seis horas después de la fermentación una muestra dió 2,75 mg/ml de α -aminobencilpenicilina en el líquido de fermentación.
- 5.

Ejemplo 9º

- Corynebacterium fascians* ATCC 12975 fue empleado como cepa y fue en iguales condiciones que el ej. 6. Una disolución de 3 mg/ml de Penicilina G en forma de sal potásica se añadió en sustitución del ácido penicilánico a la mezcla de reacción como en el ej. 1. Los otros productos de reacción fueron como en el ej. 6.
- 10.
- Después de 5 horas de reacción se encontró en una muestra de la solución, 1,86 mg/ml de α -aminobencilpenicilina.
- 15.

Ejemplo 10º

- Tres diferentes cepas: *Micrococcus ureae* ATCC 21288, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 21293 y *Nocardia globerula* ATCC 21022 se emplearon como microorganismos de inoculación.
- 20.

El medio de fermentación empleado para la mezcla fue

389257 75



el descrito en el ejemplo 6. Después de 72 horas se añadió la sal potásica de penicilina G así como p-Aminofenilacetato de etilo al líquido de fermentación en igual cantidad 4 mg/ml ó también 15 mg/ml, sin que para ello las células de los microorganismos se separen de la disolución.

5. El pH del líquido de fermentación se mantuvo en 5,8, si el líquido de fermentación varia, se compensa con clorhídrico o sosa según sea necesario, después de 3 horas el pH cambia a 7,2. Este pH se mantiene controlado cada 30 minutos.

10. La cantidad de p-aminobencilpenicilina que se obtiene en el líquido de reacción se describe en la siguiente tabla:

Tabla I

15.	<u>Cepas de microorganismos</u>	<u>-Cantidad encontrada de p-aminobencilpenicilina mg/ml</u>
	Micrococcus ureae ATCC 21288	2,37
	Mycobacterium smegmatis ATCC 21293	3,09
	Nocardia globerula ATCC 21022	2,75

389257



REIVINDICACIONES

Descrito el objeto del presente invento se declaran como no divulgadas ni practicadas en España las siguientes reivindicaciones.

5. 1. Procedimiento para la obtención de derivados de penicilina, caracterizado por realizarse a través de ácido-6-aminopenicilánico o una penicilina, con α -aminobenzilacetato en el caso de α -aminobenzilpenicilina o p-aminobencilacetato en el caso de la p-aminobencilpenicilina en presencia de algunas enzimas para su transformación, los
 10. cuales se obtienen por fermentación de algunos microorganismos, como Pseudomonas, Arthrobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, Micrococcus, Mycobacterium, Nocardia, Kluyvera, Rhodopseudomonas y Streptomyces, fermentación
 15. realizada en un medio aeróbico en una solución acuosa con elementos nutritivos, y la α -amino-benzilpenicilina ó la p-aminobencilpenicilina, se separa de la solución reaccional obtenida.
-
20. 2. Procedimiento para la obtención de derivados de penicilina según la reivindicación 1 y caracterizado porque los microorganismos empleados asimilan hidrocarburo y porque el medio de alimentación transforma como mínimo

389257



un hidrocarburo como fuente de producción de carbono.

3. Procedimiento para la obtención de derivados de penicilina según la reivindicación 1 y caracterizado porque la fermentación se realiza entre los pH 3-8.

5. 4. Procedimiento para la obtención de derivados de penicilinas según la reivindicación 1 y caracterizado porque la temperatura de reacción oscila entre 25 y 50°C.

10. 5. Procedimiento para la obtención de derivados de penicilinas según la reivindicación 1 y caracterizado porque la reacción se realiza a un pH 5,5-7,5

6. Procedimiento para la obtención según la reivindicación 5 y caracterizado porque la reacción se realiza a una temperatura entre 35 y 38°C.

15. 7. Procedimiento para la obtención según la reivindicación 1 y caracterizado porque los reactantes de Penicilina empleados para su transformación fueron Penicilina G, Penicilina V o sus sales de sodio o potasio.

20. 8. Procedimiento para la obtención según la reivindicación 1 y caracterizado porque los reactantes de α -amino-bencil-acetato empleados son en forma de, amida, ester metílico, ester etílico, ester tioglicólico, clorhidratos, sales de sodio y sales de potasio.

389257



9. Procedimiento de obtención según la reivindicación 1 y caracterizado porque el p-amino-bencilacetato empleado como reactante es en forma también de Amida, Ester metílico, Ester etílico, Ester tioglicólico, en forma de clorhidrato o de las sales de sodio y potasio.

10. Procedimiento de obtención de α -Aminobencilpenicilina o p-Aminobencilpenicilina caracterizado porque el ácido 6-Aminopenicilánico o una penicilina, se hace reaccionar con α -Aminobencilacetato en el caso de la α -Aminobencil penicilina o haciendo la reacción con p-Aminobencilacetato en el caso de la p-Aminobencilpenicilina a una temperatura entre 25 y 50°C así como a un pH 3-8 en el medio enzimático adecuado, el cual se forma por medio de microorganismos entre los cuales los más importantes son, Pseudomonas, Arthrobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, Micrococcus, Mycobacterium, Nocardia, Kluyvera, Rhodopseudomonas y Streptomyces. Que la fermentación se realiza en un medio aerobio de una disolución acuosa con el medio de cultivo apropiado a una temperatura entre 20-50°C. y a un pH aproximado de 5-9 y que la α -aminobencilpenicilina ó la p-Amino bencilpenicilina se pueden separar de la solución reaccionante.

11. Procedimiento de obtención según la reivindicación 2 y caracterizado porque los microorganismos empleados

389257



asimilan hidrocarburos, conservando en el medio de cultivo aproximado por lo menos un hidrocarburo como fuente de obtención de carbono.

5. 12. Procedimiento según la reivindicación 10 caracterizado porque los microorganismos empleados consistieron en *Pseudomonas* ATCC 21284.
13. Procedimiento según la reivindicación 10 y caracterizado porque los microorganismos empleados consistieron en *Kluyvera citrophila* ATCC 21285.
10. 14. Procedimiento según la reivindicación 10 y caracterizado porque los microorganismos empleados consistieron en *Rhodopseudomonas spheroides* ATCC-21286.
15. 15. Procedimiento según la reivindicación 10 caracterizado porque los microorganismos empleados consistieron en *Micrococcus ureae* ATCC 21288.
16. Procedimiento según la reivindicación 10 y caracterizado porque los microorganismos empleados consistieron en *Streptomyces phaeochromogenes* ATCC 21289.
20. 17. Procedimiento según la reivindicación 10 y caracterizado porque los microorganismos empleados consistieron en *Nocardia globarula* ATCC 21292.
18. Procedimiento según la reivindicación 11,

389257



caracterizado porque los microorganismos empleados consistieron en *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15246.

5. 19. Procedimiento según la reivindicación 11, y caracterizado porque los microorganismos empleados consistieron en *Brevibacterium corinum* ATCC 15112.

20. Procedimiento según la reivindicación 11, y caracterizado porque los microorganismos empleados consistieron en *Arthrobacter simplex* ATCC 15799.

10. 21. Procedimiento según la reivindicación 11, y caracterizado porque los microorganismos empleados consistieron en *Corynebacterium fascians* ATCC 12975.

22. Procedimiento según la reivindicación 11 y caracterizado porque los microorganismos empleados consistieron en *Mycobacterium smegmatis* ATCC 21293.

15. 23. Procedimiento según la reivindicación 11 y caracterizado porque los microorganismos empleados consistieron en *Nocardia globerula* ATCC 21022.

24. Procedimiento para la obtención de derivados de Penicilina.

20. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva, que consta de 22 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 15 MAR 1971

P.º. M.ª LUISA ISERL CUYAS

P.º. F.º
Firmado: JOSÉ RODRÍGUEZ

