

10



Int. Cl.²: C12D

418639

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un_a

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY.

RESIDENCIA: 307 East McCarty Street, INDIANAPOLIS,
Indiana, U.S.A.-

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION
DE PENICILINSULFOXIDO.

Prioridad: Patente estadounidense n.º 288,459 del 12-9-72
años.-



1 Esta invención se refiere a un procedimiento para la preparación de penicilinsulfóxido a partir de caldos de fermentación filtrados que contienen penicilina.

5 En el procedimiento de esta invención, el caldo filtrado es concentrado hasta una concentración eficaz de penicilina, diluido con un diluyente orgánico miscible, pulido (filtrado) si se desea, para separar la materia insoluble; el filtrado es enfriado y tratado con un agente oxidante para
10 convertir la penicilina en penicilinsulfóxido, la mezcla oxidada es tratada con ácido para reducir el pH de la mezcla a un valor suficientemente bajo para favorecer la cristalización del penicilinsulfóxido, generalmente a un pH entre 1,5 y 2,5, diluyendo la mezcla acidulada con un medio acuoso para optimizar la cristalización del penicilinsulfóxido y precipitando y separando el penicilinsulfóxido ácido sólido del medio líquido.
15

 Mediante este procedimiento, se elimina la etapa previa de formación de una sal cristalina de penicilina, anterior a la formación de sulfóxido y también se elimina la necesidad de extraer el disolvente orgánico del caldo filtrado de fermentación de la penicilina. Además, los rendimientos de penicilinsulfóxido para una cantidad dada de licor de fermentación de penicilina son considerablemente aumentados y su pureza es inesperadamente alta.
20

25 Esta invención proporciona un procedimiento para la preparación de penicilinsulfóxido ácido sólido o sales del mismo, directamente a partir del caldo de fermentación filtrado que contiene penicilina. Este procedimiento puede ser descrito, por ejemplo, como una combinación de una serie de etapas, aunque no pretendemos que nuestro procedimiento reinvi
30



1 dicado incluya necesariamente todas estas etapas en el orden
 dado. Las diversas etapas son citadas como un medio convenien
 te de describir el mejor modo de poner en práctica el proce-
 dimiento considerado por nosotros en este momento. Este proce-
5 dimiento consiste en:

 (a) concentrar el caldo de fermentación que con-
 tiene penicilina, del que se ha separado el micelio de peni-
 cilina, hasta un volumen de líquido eficiente, que estimamos
 que debe encontrarse a una concentración de 200 a 400 miligra-
10 mos de sólido por mililitro de volumen líquido,

 (b) diluir el líquido concentrado procedente de
 la etapa (a) con alrededor de 0,5 a 3 volúmenes, preferible-
 mente alrededor de 0,5 a 2 volúmenes, de un líquido orgánico
 miscible, v.g. acetona, por volumen de caldo concentrado,

15 (c) precipitar y separar, si se desea, la mate-
 ria insoluble de la mezcla diluida de la etapa (b),

 (d₁) si se desea, el líquido orgánico, v.g. ace-
 tona, puede ser separado del filtrado de la etapa (c), aunque
 esta etapa no es necesaria,

20 (d₂) tratar el líquido (filtrado) de la etapa (c)
 o el residuo de solución acuosa de la etapa (d₁) con un agen-
 te oxidante capaz de oxidar una penicilina a un penicilinsul-
 fóxido y que sea por lo menos parcialmente soluble en la mez-
 cla líquida en una cantidad suficiente para efectuar la oxi-
25 dación de la penicilina contenida en la misma, a una tempera-
 tura comprendida entre -20°C y 25°C aproximadamente,

30 (e) tratar la mezcla oxidada de la etapa (d) con
 un ácido para reducir el pH de la mezcla a un valor suficien-
 temente bajo para favorecer la cristalización del penicilin-
 sulfóxido, que para la mayoría de las penicilinas comúnmente



1 empleadas es del orden de 1,5 a 2,5 aproximadamente,

(f) diluir la mezcla tratada con ácido procedente de la etapa (e) con agua suficiente o con otro medio acuoso para optimizar la cristalización del penicilinsulfóxido ácido de la fase líquida y

(g) separar el penicilinsulfóxido sólido de la mezcla de la etapa (f).

El caldo de fermentación filtrado que contiene la penicilina puede ser utilizado en este procedimiento sin concentrarlo para obtener bajos rendimientos y/o bajas calidades del producto penicilinsulfóxido. Preferimos concentrar el caldo de fermentación antes de su dilución con el diluyente orgánico. Para este fin puede utilizarse el equipo de evaporación convencional que impone presiones reducidas sobre el líquido.

En la etapa (b) el caldo de fermentación filtrado, preferiblemente concentrado, se diluye con alrededor de 0,5 a 3 volúmenes de cualquier líquido orgánico miscible que contribuye a separar de la mezcla las impurezas indeseables en forma de precipitado. Si la cantidad de sólidos es importante, la mezcla se filtra o centrifuga para separar el sólido del filtrado acuoso/orgánico que contiene la penicilina. Si la cantidad de sólidos es pequeña y pueden ser arrastrados a través del proceso sin perjudicar al rendimiento ni a la calidad del penicilinsulfóxido producido, puede no ser necesaria esta separación. Sin embargo, preferimos separar esta materia insoluble para obtener un producto más puro. Pueden utilizarse diversos líquidos orgánicos miscibles y parcialmente miscibles para diluir el caldo filtrado concentrado. Se prefiere la acetona aunque pueden utilizarse otros líqui-



1 dos orgánicos como metil-etil-cetona, metanol, etanol, isopro-
panol, terc-butanol, acetonitrilo, propionitrilo y similares,
aunque no necesariamente con rendimientos mejorados equiva-
lentes de penicilinsulfóxido. Después de haber separado cual-
5 quier impureza insoluble de la mezcla acuoso/orgánica, puede
separarse la fase orgánica por evaporación, si se desea, pa-
ra dejar una solución acuosa de penicilina, aunque preferimos
arrastrar el componente diluyente orgánico durante todo el
proceso.

10 La solución acuosa o acuoso/orgánica de penicili-
na obtenida en la forma antes descrita se trata después con
un agente oxidante que formará un penicilinsulfóxido. Como
ejemplos de agentes oxidantes para este fin citaremos el áci-
do peracético, ácido perpropiónico, ácido perbenzoico y áci-
15 do persuccínico. Preferimos utilizar ácido peracético (42 %
o menos en peso, tal como se encuentra en el mercado) o áci-
do persuccínico. Para asegurar la formación óptima de penici-
linsulfóxido se utiliza un exceso molar del agente oxidante
con respecto a la penicilina contenida en la solución. Gene-
20 ralmente son suficientes de 1 a 3 moles de agente oxidante
por mol de penicilina pero, si se desea, pueden emplearse
cantidades mayores que estas. La oxidación se realiza mien-
tras la penicilina es enfriada preferiblemente entre -15°C y
 $+5^{\circ}\text{C}$ para una eficacia máxima de la reacción y un uso óptimo
25 de los materiales.

30 Cuando la oxidación es esencialmente completa,
la mezcla de reacción se trata con un ácido para reducir el
pH hasta un punto donde sea favorecida la cristalización del
penicilinsulfóxido. Para la mayoría de las penicilinas común-
mente utilizadas, v.g. fenoximetilpenicilina y bencilpenici-



1 lina, el intervalo de pH estará comprendido entre 1,5 y 2,5
aproximadamente. Otros penicilinsulfóxidos pueden cristalizar
mejor a intervalos de pH que difieren algo del citado, pero
este se considera el intervalo de pH más favorable para la
5 cristalización de la mayoría de los penicilinsulfóxidos. Co-
mo ejemplos de ácidos que pueden ser utilizados citaremos los
ácidos metanosulfónico, p-toluensulfónico, clorhídrico, sulfú-
rico, ortofosfórico y nítrico, prefiriéndose el ácido metano-
sulfónico.

10 Para favorecer la cristalización del penicilinsul-
fóxido sólido y su separación del medio líquido, preferimos
agregar agua adicional para optimizar la separación del pro-
ducto cristalino penicilinsulfóxido. El agua puede agregarse
antes de la adición del ácido antes citado, simultáneamente
15 con esta adición o además y posteriormente a dicha adición.

20 Cuando la precipitación del penicilinsulfóxido pro-
ducido es esencialmente completa, la mezcla puede ser tratada
para separar el penicilinsulfóxido cristalino de las aguas
madres líquidas. La filtración o la centrifugación ilustran
estos procedimientos de separación.

25 Mediante este procedimiento, hemos encontrado ines-
peradamente que la transformación de la penicilina de los lí-
quidos de fermentación en penicilinsulfóxido puede ser sim-
plificada y realizarse más económicamente. Esta simplifica-
ción y economía vienen ilustradas por la eliminación de la
necesidad de extraer con un disolvente orgánico los líquidos
de fermentación filtrados para extraer la penicilina que con-
tienen y por el aumento inesperado del rendimiento de penici-
30 linsulfóxido de una pureza sorprendentemente alta para una
cantidad dada de penicilina en el caldo de fermentación fil-



10

1 trado.

La invención es ilustrada además por los siguientes ejemplos detallados, dados a título ilustrativo de las variables del procedimiento de la invención y no como limitaciones de la misma.

5

EJEMPLO 1

En este ejemplo se compara el procedimiento mejorado de esta invención con un procedimiento convencional de obtención de fenoximetilpenicilinsulfóxido ácido. Este ejemplo detallado ilustra una mejora definida en cuanto al rendimiento del penicilinsulfóxido ácido a partir de una cantidad dada de caldo filtrado de penicilina.

10

(A) Procedimiento convencional

Una porción de caldo filtrado conteniendo 24,15 g de fenoximetilpenicilina se extrae con 1/3 volúmenes de acetato de amilo a pH 2,0. Se separan las fases acuosa y orgánica. A la fase de acetato de amilo se añade una solución concentrada de acetato potásico hasta tres veces la concentración molar de la penicilina. La sal fenoximetilpenicilina potásica cristalizada resultante se filtra, se lava con alcohol isopropílico y se seca a 40°C en una estufa de vacío. Estos cristales de sal de fenoximetilpenicilina potásica contienen 16,2 g de actividad de penicilina con un rendimiento del 67,2 % con respecto al caldo filtrado.

15

20

25

Una parte de esta sal cristalina de fenoximetilpenicilina potásica, que contienen 15,75 g de fenoximetilpenicilina ácida (que representa 23,4 g de penicilina del caldo) se disuelve en 50 ml de agua. Se añaden 40 ml de acetona. La mezcla se enfría a 0°C y se oxida con un exceso de ácido peracético al 40 % a esa temperatura.

30



1 Veinte minutos después de la oxidación, la solu-
ción se calienta a 25° y el pH de la mezcla se reduce a 2,0
con ácido metanosulfónico al 70 % para iniciar la cristaliza-
ción. Se añaden 25 ml de agua y la mezcla se enfría a unos
5 5° C para completar la cristalización. Se filtra la mezcla
cristalizada y el producto se lava con dos veces el volumen
de la torta de agua antes de secarlo durante 4 horas a 58° C
en una estufa de vacío.

10 El producto fenoximetilpenicilinsulfóxido ácido
pesa 15,5 g. Su pureza es del 96,8 %; corrigiendo el agua,
es del 99,4 %. El rendimiento de sulfóxido a partir de los
cristales de sal fenoximetilpenicilina potásica es del 91,0 %, lo que representa un rendimiento global a partir del caldo filtrado del 61,2 %.

15 (B) Proceso del caldo filtrado concentrado

Una porción del caldo filtrado (conteniendo
24,15 g de fenoximetilpenicilina) se concentra a vacío hasta
una concentración de sólidos de unos 260 mg/ml, a 27-29° C,
durante 5 horas. Se añade una cantidad de acetona igual al
20 volumen del concentrado. El precipitado resultante se sepa-
ra por filtración a presión con ayuda de un auxiliar de fil-
tración.

Un tercio del filtrado procedente de la filtra-
ción anterior se deja aparte para otras operaciones. El 66 %
25 restante del volumen original del filtrado, que representa
15,9 g de la actividad de fenoximetilpenicilina del caldo
inicial, es oxidado a 0° C con un exceso de ácido peracético
comercial al 40 %. Después de 20 minutos, la mezcla se ca-
lienta a 25° C y el pH de la misma se reduce a 2,0 con ácido
30 metanosulfónico al 70 %. Se añade un volumen de agua equiva-



1 lente a 1,3 veces el volumen del concentrado inicial, repre-
sentado por la parte alícuota utilizada y la mezcla se en-
fría a unos 5°C para completar la cristalización. Los crista-
les de fenoximetilpenicilinsulfóxido ácido se filtran y la-
5 van con dos veces el volumen de la torta de agua. El produc-
to se seca en una estufa de vacío durante 5,5 horas a 58°C.

El fenoximetilpenicilinsulfóxido ácido seco pesa
14,2 g. La pureza es del 97,9 %; corrigiendo el agua, es del
99,7 %. El rendimiento de producto final a partir del caldo
10 filtrado es del 83,5 %.

EJEMPLO 2

Una porción de caldo de fermentación filtrado
que contiene 27 g de bencilpenicilina ácida se concentra has-
ta aproximadamente la novena parte de su volumen. Este líqui-
do concentrado se trata con 16 ml de ácido peracético al 40 %
15 a 0-10°C. Cuando la reacción de oxidación es prácticamente
completa, la mezcla se deja calentar a 25°C y se añaden 4 ml
más de solución de ácido peracético al 40 %.

A la mezcla antes descrita se añaden alrededor
20 de 0,9 volúmenes de acetato de etilo y el pH de la mezcla se
reduce a 2,0 con ácido metanosulfónico al 70 %. Una parte
alícuota de 100 ml de la fase disolvente se lava con agua y
se seca para dar 10 g de bencilpenicilina sólida amorfa con
una pureza de bencilpenicilina de 76,6 %. Esto es equivalen-
25 te a un rendimiento del 73,2 % a partir del caldo filtrado.
La identidad del bencilpenicilinsulfóxido ácido es confirma-
da por cromatografía en capa fina y una curva infrarroja.

EJEMPLO 3

Se repite prácticamente el procedimiento del Ejem-
plo 1, pero empleando ácido persuccínico como agente oxidante.
30



1 El ácido persuccínico puede ser preparado por el procedimien
to descrito en la página 620 de la obra Reagents for Organic
Synthesis, L.F. Fieser y M. Fieser, publicada por John Wiley
and Sons, Inc (1967); Aunque se utiliza en este experimento
5 una cantidad insuficiente de ácido persuccínico, se obtiene
un rendimiento del 63,5 % del producto fenoximetilpenicilin-
sulfóxido ácido (basado sobre la cantidad de caldo filtrado).
El fenoximetilpenicilinsulfóxido ácido producido tiene una
pureza del 97,8 %.

10

EJEMPLOS 4 a 7

Se repite prácticamente el procedimiento del Ejem
plo 1, a excepción de que se compara el efecto del diluyente
acetona para el caldo filtrado y concentrado de fenoximetil-
penicilina con los efectos de volúmenes equivalentes de otros
15 diluyentes orgánicos.

15

El diluyente orgánico indicado, el rendimiento
de producto fenoximetilpenicilinsulfóxido ácido (calculado
sobre el contenido en penicilina del caldo filtrado) y la pu-
reza de los productos respectivos están indicados en la si-
20 guiente tabla:

20

Efecto de diversos diluyentes orgánicos

<u>Diluyente</u>	<u>Rendimiento a partir del caldo filtrado (Porcentaje del teórico)</u>	<u>Pureza, % en peso</u>
25 Acetona	87,2	99,2
Metanol	75,7	96,4
Isopropanol	75,7	96,1
Acetonitrilo	61,7	98,5

25

EJEMPLOS 8 a 11

30

Se repite prácticamente el procedimiento del



1 Ejemplo 1, a excepción de que se compara el efecto del ácido
 do metanosulfónico en la etapa de cristalización sobre el
 rendimiento del producto fenoximetilpenicilinsulfóxido ácido
 con el uso de cantidades equivalentes de otros ácidos. Los
 5 resultados se encuentran en la siguiente tabla:

Efecto de diversos ácidos

<u>Acido</u>	<u>Rendimiento a partir del caldo filtrado (Porcentaje del teórico)</u>	<u>Pureza, porcentaje en peso</u>
10 CH ₃ SO ₃ H, 70 %	79,2	99,4
H ₂ SO ₄ , 30 %	78,3	98
HCl conc.	76	98,2
H ₃ PO ₄ , 85 %	76	97,2

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

15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de penicilinsulfóxido que consiste en diluir un caldo de fermentación filtrado que contiene penicilina con un líquido orgánico miscible en cantidad suficiente para producir la precipitación de la materia insoluble distinta de la penicilina, tratar la solución resultante que contiene penicilina, a una temperatura comprendida aproximadamente entre -20°C y 25°C, con un agente oxidante perácido que es soluble en la mezcla líquida, en cantidad suficiente para efectuar la oxidación de la penicilina a penicilinsulfóxido, tratar la mezcla oxidada con un ácido para reducir el pH e inducir la cristalización del penicilinsulfóxido, mezclar un medio acuoso con la mezcla acidulada para optimizar la cristalización del penicilinsulfóxido y separar este último de la mezcla líquida.

25

30

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1,



1 donde el caldo de fermentación filtrado que contiene la penicilina es concentrado hasta unos 200 a 400 miligramos de sólido por mililitro de volumen líquido antes de diluir este caldo.

5 3. Un procedimiento según la Reivindicación 2, donde el caldo de fermentación filtrado y concentrado es diluido con alrededor de 0,5 a 2 volúmenes de acetona por volumen de caldo.

10 4. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1, 2 o 3, donde se utiliza ácido peracético para oxidar la penicilina a penicilinsulfóxido.

15 5. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1, 2, 3 o 4, donde se agrega ácido metanosulfónico para reducir el pH de la mezcla de penicilina oxidada hasta un valor comprendido entre 1,5 y 2,5 aproximadamente.

20 6. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, donde se prepara y recupera fenoximetilpenicilinsulfóxido a partir de un caldo filtrado de fenoximetilpenicilina.

25 7. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, donde se prepara y recupera bencilpenicilinsulfóxido a partir de un caldo filtrado de bencilpenicilina.

30 8. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE PENICILINSULFOXIDO".

ME



1

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de trece páginas mecanografiadas.

5

Madrid, 10 de setiembre de 1.973

BERNARDO UNGRIA

P.P.

A handwritten signature in dark ink is written over the typed name "BERNARDO UNGRIA" and the "P.P." marking. The signature is stylized and appears to be "B. Ungria".

10

15

20

25

30

Handwritten initials "ME" are written in the bottom left margin of the page.