



Nº 420.695.

C O 7 C

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un.a

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: BEECHAM GROUP LIMITED

RESIDENCIA: Beecham House, Great West Road,

BRENTFORD, Middlesex, Inglaterra.

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION
DE ACIDO 6-AMINOPENICILANICO.

Prioridad: Patente británica n.º 53822/72 del 21.11.72
" " 44542/73 " 22. 9.73



1

Esta invención se refiere a un procedimiento mejora-
do para la preparación de ácido 6-aminopenicilánico (en ade-
lante denominado 6-APA). La invención también se refiere a
preparaciones especiales de enzimas para uso en este procedi-
miento.

5

10

Es sabido que el 6-APA puede ser producido por acción
sobre una penicilina de ciertos enzimas que escinden el enla-
ce amido de la penicilina. Los enzimas que son conocidos por
escindir este enlace amido son denominados en lo que sigue
enzimas penicilin-deacilasa, aunque también pueden ser des-
critos como penicilin-amidasas.

15

Se sabe como ligar los enzimas penicilin-deacilasa a
materiales poliméricos insolubles en agua, produciendo con
ello un complejo enzimático insoluble en agua que retiene su
actividad de penicilin-deacilasa. Estos complejos enzimáticos
insolubles son valiosos porque el 6-APA resultante está prác-
ticamente exento de enzimas. Además, el complejo enzimático
es fácilmente almacenado y transportado.

20

25

También es sabido que pueden prepararse complejos en-
zimáticos solubles en agua combinando los enzimas con materia-
les poliméricos solubles en agua. Sin embargo, hasta ahora
no se ha propuesto el uso de un enzima penicilin-deacilasa
de esta forma. Esto es debido indudablemente a que está con-
traindicado por la creencia de que este complejo no podría
ser fácilmente separado y recuperado para ser utilizado de
nuevo de la mezcla de reacción acuosa empleada para producir
el 6-APA y que el uso de un enzima de este tipo de esta mane-
ra difícilmente sería comercialmente factible.

30

Ahora se ha encontrado que los enzimas penicilin-
deacilasa pueden ser ligados a materiales poliméricos solu-



1 bles en agua para producir complejos enzimáticos solubles en
agua y que estos complejos conservan la actividad de acilasa
del enzima libre. Además, también se ha encontrado que, cuan-
do este complejo enzimático se utiliza en la producción de
5 ácido 6-aminopenicilánico, pueden emplearse soluciones más
concentradas que con los complejos insolubles en agua y esto
conduce a las ventajas económicas de mayor producción o a la
posibilidad de utilizar una planta química de menor tamaño.
Además, se ha encontrado que el complejo enzimático soluble
10 en agua puede ser separado de la solución acuosa de 6-APA pro-
ducida mediante el uso de técnicas de ultrafiltración. Esto
deja la solución acuosa de 6-APA y la penicilina que no haya
reaccionado de la que puede aislarse fácilmente el 6-APA por
concentración de la solución, seguida de ajuste del pH hasta
15 aproximadamente el punto isoeléctrico de 4,3. El complejo
enzimático separado se encuentra todavía en solución acuosa
y se ha encontrado que retiene su actividad desacilasa en
un alto grado. Estas dos propiedades permiten que sean reuti-
lizados sin ningún otro tratamiento. Además, estos complejos
20 enzimáticos permiten la preparación de 6-APA en soluciones
de mayor concentración. Por lo tanto, estos descubrimientos
hacen posible la producción económica de 6-APA, especialmen-
te mediante un procedimiento continuo realizado en todas sus
fases en un medio acuoso homogéneo.

25 De acuerdo con uno de sus aspectos, la invención pro-
porciona un procedimiento para la preparación de ácido 6-ami-
nopenicilánico, que consiste en poner en contacto, en una
solución acuosa mantenida a un pH comprendido entre 6,0 y 9,0,
la bencilpenicilina o la fenoximetilpenicilina, o una sal de
30 las mismas, con un complejo enzimático soluble en agua en el



1 que un enzima penicilin-deacilasa está combinado a un mate-
rial polimérico inerte soluble en agua; a continuación, se-
parar el citado complejo enzimático de la mezcla de reacción
acuosa mediante una técnica de ultrafiltración; recuperar el
5 ácido 6-aminopenicilánico formado; y reutilizar la solución
acuosa separada del complejo enzimático poniéndolo en contac-
to con una nueva cantidad de la penicilina.

Los citados complejos enzimáticos son nuevos. Por
consiguiente, en un segundo aspecto, la invención también pro-
10 porciona un complejo enzimático insoluble en agua constituí-
do por un enzima penicilin-deacilasa combinado con un material
polimérico inerte insoluble en agua.

Preferiblemente, el enzima deacilasa para esta apli-
cación se obtiene a partir de bacterias, como las variedades
15 de Escherichia coli, cuando se utilizan para la escisión de
la bencilpenicilina o a partir de hongos o Actinomyces
cuando se utiliza para la escisión de la fenoximetilpenicili-
na. Estos enzimas son en general muy conocidos. Se utilizan
en la producción del 6-APA dentro de un intervalo de pH de
20 6,0 a 9,0 y preferiblemente un pH de 7,0 a 8,5. Como la deaci-
lación de una penicilina da lugar a la liberación de un áci-
do libre de la cadena lateral de la penicilina, es necesario
mantener el intervalo de pH antes mencionado durante el pro-
ceso de preparación del 6-APA por adición del álcali nece-
25 sario, por ejemplo una solución de hidróxido sódico o amóni-
co o de trietilamina.

Para preparar los complejos enzimáticos solubles en
agua de esta invención puede utilizarse una amplia variedad
de materiales poliméricos solubles en agua y los que son es-
30 pecialmente útiles pueden ser determinados solamente sobre



1 una base empírica.

5 Un tipo de polímero que ha resultado ser especialmente adecuado son los copolímeros solubles en agua del anhídrido maleico. Por ejemplo, pueden utilizarse copolímeros solubles en agua de anhídrido maleico o anhídrico acrílico con el éter vinilmetílico; etileno; estireno; y/o acetato de vinilo. Una gama especialmente adecuada de copolímeros solubles en agua son los copolímeros de éter metilvinílico/anhídrido maleico vendidos bajo el nombre comercial de "Gantrez AN", en especial el "Gantrez AN 149" (un copolímero con un peso molecular de 750.000 aproximadamente) y el "Gantrez AN 169" (un copolímero con un peso molecular de 1.125.000 aproximadamente). Los copolímeros del anhídrido maleico pueden reaccionar con el enzima penicilin-deacilasa por cualquiera de los métodos generales descritos en la Offenlegungsschrift nº 1.945.680 de Alemania Occidental (patente inglesa nº 1.290.701). Por ejemplo, el enzima puede reaccionar con un polímero Gantrez AN en presencia de una solución reguladora fuerte o en presencia de otros medios para mantener un pH neutro.

15 Otros substratos poliméricos solubles en agua muy adecuados son los polisacáridos. Así, pueden utilizarse polisacáridos como el dextrano, la dextrina o la celulosa, siempre que sea soluble en agua y forme un complejo enzimático soluble en agua después de haber sido copulado con el enzima penicilin-deacilasa. Esta copulación se realiza habitualmente después de la activación apropiada del polisacárido por reacción con agentes modificantes como, por ejemplo, epíclorhidrina o haluros de cianógeno o puede ser un polisacárido que

20

25

30



1 haya sido previamente modificado para introducirle grupos re-
siduales carboximetilo, hidroxietilo o aminoetilo.

5 Además se ha encontrado especialmente adecuado usar
en esta invención los polímeros que son sacáridos u oligo-
sacáridos modificados, tales como sacarosa, dextrosa o lacto-
sa. Un polímero de este tipo especialmente útil es el que se
encuentra en el mercado bajo el nombre comercial de "Ficoll",
que es un copolímero de sacarosa y epiclórhidrina. Se ha en-
contrado que es especialmente adecuado un polímero Ficoll con
10 un peso molecular de 400.000 aproximadamente. El uso de polí-
meros de este tipo proporciona un enzima penicilin-deacilasa
soluble en agua con una gran actividad en la preparación del
ácido 6-aminopenicilánico. Sin embargo, y lo que es más im-
portante, estos complejos enzimáticos presentan una viscosidad
15 especialmente baja y esto permite que sean más fácilmente se-
parados por técnicas de ultrafiltración de la mezcla de reac-
ción en la que han sido utilizados para la preparación del
6-APA, y, por lo tanto, pueden ser separados más cómodamente
y reciclados para reutilizarlos.

20 Los complejos enzimáticos solubles en agua para uso
en esta invención pueden prepararse por cualquiera de los mé-
todos conocidos para combinar enzimas y polímeros, siempre
que el complejo resultante pueda ser considerado soluble en
agua. El uso del término "soluble en agua" aquí significa
25 que el complejo enzimático es soluble o dispersable en agua
para formar una solución verdadera o coloidal con una con-
centración de por lo menos 0,1 g/l a un pH de 7,8.

30 Estos métodos de combinación comprenden, por ejemplo,
la copulación del enzima deacilasa al polímero mediante el
uso de reactivos tales como haluros de cianógeno, especial-



1 mente bromuro de cianógeno; s-triazinas, especialmente 2-ami
no-4,6-dicloro-s-triazina; azidas, por ejemplo éter 2-hidro-
xi-3-(p-diazofenil)propílico; cianatos orgánicos como ciana-
5 to de fenilo; y di-organo-carbo-di-imidas. Frecuentemente es-
tos agentes ligantes se utilizan primero para reaccionar con
el polímero y proporcionar grupos reactivos sobre el mismo,
grupos que después se hacen reaccionar con el enzima. En al-
gunos casos, los enzimas pueden reaccionar directamente con
10 el polímero, por ejemplo si éste contiene, o ha sido modifi-
cado para que contenga, ciertos grupos activos como uniones
anhídrido o sustituyentes aminoetilo, hidroxietilo o carbo-
ximetilo.

Los complejos utilizados en esta invención también
pueden prepararse combinando el enzima con un polímero inso-
luble en agua, por ejemplo dextrano reticulado y después ha-
ciendo soluble en agua el complejo resultante mediante un
15 proceso de degradación apropiado, v.g. por hidrólisis parcial
o por reacción de un dextrano reticulado con dextranasa.

También es posible modificar la actividad de los com-
plejos enzimáticos para uso en esta invención combinando el
enzima con los substratos poliméricos mediante grupos separa-
bles. Así, el enzima puede ser combinado con el polímero me-
diante puentes formados, por ejemplo, a partir de dialdehidos,
20 glioxal o gliceraldehído y/o por diaminas, como 1,6-hexame-
tilendiamina o etilendiamina y/o ácidos carboxílicos α, ω -ami-
25 noalifáticos como glicina o ácido α -aminohexanoico.

El enzima penicilin-deacilasa puede ser ligado al po-
límero dentro de un amplio intervalo de proporciones, por
ejemplo dentro de una relación ponderal de polímero a enzima
de 0,1 a 100:1. Sin embargo, se prefiere emplear el polímero
30



1 y el enzima en una proporción de polímero a proteína comprendida entre 2:1 y 20:1.

5 Después de su preparación, el complejo enzimático soluble en agua puede ser purificado convenientemente antes de usarlo por ultrafiltración o por cromatografía de permeación de gel, v.g. sobre Sephadex G-100.

10 Los derivados enzimáticos solubles en agua de esta invención mantienen la actividad del enzima deacilasa inicial y, por lo tanto, pueden ser utilizados en procesos continuos o discontinuos para la producción de 6-APA.

15 Una parte integrante de la planta utilizada para la producción de 6-APA utilizando los complejos de esta invención es una instalación de ultrafiltración. Esto implica el uso de una membrana semipermeable con límites de exclusión que permitan el paso de las sustancias de bajo peso molecular pero impidan el paso de las sustancias de alto peso molecular. El límite de exclusión se selecciona de acuerdo con el peso molecular del complejo enzimático. Está seleccionado para permitir el paso del 6-APA pero para excluir el complejo de enzima/polímero, permitiendo así su recuperación para ser utilizado de nuevo.

20 Mediante la técnica de ultrafiltración, se recupera el complejo soluble en agua en una solución acuosa y esto permite que sea reciclado directamente para ser utilizado de nuevo. En general no es necesario purificar el complejo enzimático antes de reutilizarlo.

25 Un método especialmente adecuado que puede utilizarse para la producción continua de 6-APA de acuerdo con esta invención será descrito ahora haciendo referencia al dibujo que acompaña a esta memoria, que es una representación esque-

30



1 mática de una planta química adecuada para el fin citado.

5 Un tanque reactor 1 se provee de un agitador 2 y una
camisa a través de la cual circula agua a una temperatura pre-
determinada desde la entrada 3 a la salida 4. La vasija con-
tiene un elemento 5 sensible al pH que, mediante un contro-
lador 6, acciona una llave 7 en una línea de alimentación 8
a través de la cual se introduce una solución alcalina para
mantener el pH del contenido de la vasija 1 en un valor pre-
determinado. En el tanque reactor 1 puede bombearse una solu-
10 ción de la penicilina mediante la bomba 9 situada en el con-
ducto 10 procedente de un tanque de almacenamiento 11 provis-
to de un agitador 12, estando también provisto el tanque 11
de una camisa de agua con una entrada 13 y una salida 14, a
través de la cual puede pasar agua para controlar la solu-
15 ción de penicilina a la temperatura de reacción deseada.

La mezcla de reacción puede sacarse del tanque reac-
tor 1 a través del conducto 15 y bombearse mediante una bom-
ba 16 a la unidad de ultrafiltración 17. La solución reteni-
da en esta unidad es devuelta por el conducto 18 al tanque
20 reactor 1.

La solución filtrada procedente de la unidad de ul-
trafiltración 17 puede pasar directamente a una unidad de re-
cuperación (no mostrada) donde el 6-APA formado puede separar-
se como sólido cristalino después de la concentración conven-
25 cional de la solución y del ajuste del pH hacia el punto iso-
eléctrico del 6-APA. Sin embargo, preferiblemente la solución
filtrada procedente de la unidad 17 atraviesa el conducto 19
hasta otro tanque reactor 20, provisto como el tanque reac-
tor 1 de una camisa de agua con una entrada 21 y una salida
30 22, un agitador 23, un elemento 24 sensible al pH y una uni-



1 dad de control del pH 25 que acciona una llave 26 en un con-
ducto de alimentación de álcali 27. La mezcla de reacción se
saca del segundo tanque reactor 20 por el conducto 28 median-
te una bomba 29 para pasarla a una segunda unidad de ultra-
5 filtración 30 desde la que la solución retenida es reciclada
por el conducto 31 al segundo tanque reactor 20 y la solución
filtrada pasa por el conducto 32 a una unidad de recuperación
(no mostrada) donde el 6-APA formado es recuperado como ya
se ha descrito.

10 En este procedimiento, preferiblemente se emplea una
solución de bencilpenicilina a una concentración del orden
del 7 % en peso/volumen, junto con una cantidad del complejo
enzimático suficiente para degradar alrededor del 90 % de la
penicilina en 3 horas. La mezcla de reacción se saca del tan-
que 1 y en el mismo se bombea una solución de penicilina lim-
15 pia procedente del tanque 11, a caudales controlados de tal
manera que el tiempo de permanencia medio de la solución en
el reactor sea alrededor de 3 horas. Así, el contenido del
tanque 1 se deja reaccionar durante 3 horas antes de sacar
20 nada por el conducto 15 y de dejar entrar solución limpia
por el conducto 10. En el segundo tanque reactor 20, el tiem-
po de permanencia medio se controla mediante las bombas 16 y
29 para que sea alrededor de 1 hora, que es suficiente para
asegurar la degradación de la penicilina que posiblemente
25 no haya reaccionado en el primer tanque reactor 1 y que pase
con el 6-APA formado a través de la primera unidad de ultra-
filtración 17.

30 En la planta química antes descrita, las vasijas de
los reactores pueden ser sustituidas si se desea por una se-
rie de reactores tubulares provistos de una camisa, dispues-



1 tos para la adición consecutiva de solución alcalina a medida
que la mezcla de reacción pasa a través de ellos.

5 Esta reacción continua es especialmente fácil de rea-
lizar cuando el complejo enzimático procede de un polisacá-
rido modificado, especialmente de un copolímero de sacarosa-
epiclorhidrina, debido a la baja viscosidad de sus solucio-
nes que permite que las operaciones de ultrafiltración se
realicen sin ningún problema tecnológico.

10 La invención es ilustrada mediante los siguientes
ejemplos en los que la actividad se expresa en micromoles de
ácido 6-aminopenicilánico producido a partir de bencilpenici-
lina a pH 7,8 y 37°C por minuto y por gramo o mililitro de
preparación.

EJEMPLO 1

15 Se agita 1 g de un copolímero de anhídrido maleico/
éter metilvinílico, con un peso molecular de 750.000 aproxi-
madamente (Gantrez AN 149) en 100 ml de solución reguladora
de fosfato 0,2 M a pH 7,4 a 4°C. Al cabo de 3 minutos, se
añaden 5 ml de una solución de enzima penicilin-deacilasa,
20 parcialmente purificado, con una actividad de 63,4 micromo-
les/minuto/ml y la mezcla se agita durante 16 horas a 4°C.
La solución viscosa resultante se somete a ultrafiltración a
través de una membrana XM-300 (Amicon Corp.), cuyo peso mo-
lecular se ha interrumpido en un valor de 300.000. La solu-
25 ción retenida se lava en la célula de ultrafiltración y fi-
nalmente se liofiliza. El complejo enzimático resultante es
soluble en agua y tiene una actividad de 220 micromoles/minu-
to/g cuando se utiliza para preparar ácido 6-aminopenicilá-
nico a partir de bencilpenicilina.



1

EJEMPLO 2

5

10

Se agitan 10 g de Gantrez AN 149 en 1 litro de solución reguladora de fosfato 0,2 M a pH 7,4 y 4°C. Al cabo de 3 minutos, se añaden 50 ml del preparado de penicilin-deacilasa empleado en el Ejemplo 1 y la mezcla se agita durante 3 horas. Después se añaden 100 ml de una solución de hexametilendiamina al 1 % y la mezcla completa se agita durante 16 horas más. Una parte del complejo enzimático soluble en agua resultante se emplea directamente para la degradación enzimática de bencilpenicilina al 6 %, en una escala de 200 ml, a pH 7,8 y 47°C. La eficacia de deacilación al cabo de un tiempo de reacción de 5 horas es del 89 %.

15

Otra parte (50 ml) del producto soluble se somete a ultrafiltración como se ha descrito en el Ejemplo 1. El producto liofilizado tiene una actividad de 168 micromoles/minuto/g.

EJEMPLOS 3-5

20

25

Estos preparados utilizan como soporte del enzima el polímero Gantrez AN 169 que es un copolímero de anhídrido maléico/éter metilvinílico, con un peso molecular de 1.125.000 aproximadamente. La adición del enzima al soporte polimérico se realiza como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los resultados, junto con los de los Ejemplos 1 y 2, se encuentran en la tabla.

30



1

5

10

15

20

25

30

Enzima de	Relación molar	Contenido de	Actividad enzimática	
			micromo-	micromo-
acilasa	polímero/enzi-	proteínas del	les/min/	les/min/mg
libre	ma en la vasi-	producto por	ml (g)	proteína
	ja de reacción	el método Fo-		
		lin-Ciocalteu		
		empleando se-		
		roalbúmina bo-		
		vina como pa-		
		trón		
Enzima de acilasa libre	-	20 mg/ml	63,4/ml	31,7
Ej. 1	2 : 1	55,0/mg/g	220/g	40,2
Ej. 2	2 : 1	52,5/mg/g	168/g	32,2
Ej. 3	1 : 1	43,3/mg/g	95,5/g	220,0
Ej. 4	2 : 1	18,6/mg/g	44,5/g	24,0
Ej. 5	1 : 2	71,4/mg/g	172/g	24,0

EJEMPLO 6

Se disuelven 5 g de Ficoll, que es un copolímero de sacarosa-epiclorhidrina con un peso molecular de 400.000, en 165 ml de agua y el pH se ajusta a 10,0 con NaOH 2 N. Se añaden 400 mg de bromuro de cianógeno a la solución de Ficoll y la solución se agita magnéticamente, manteniéndose la temperatura a 20°C. El pH se mantiene en 11,0 por adición de NaOH 2 N. Veinte minutos después de la adición del bromuro de cianógeno, la solución se ajusta a pH 8,5 con HCl 2 N y se mezcla con 170 ml de una solución acuosa de penicilin/deacilasa (560 mg de proteína) con una actividad tal que produce 6,9 micromoles de 6-APA por miligramo de proteína y por minuto a pH 7,8 y 37°C. La solución se agita durante la noche a 4°C y después se concentra por ultrafiltración a través de una membrana Amicon XM-300. Esta membrana corta el peso molecular nominal a un valor de 300.000. La solución retenida en la célula de ultrafiltración, que contiene el complejo Ficoll-penicilin-deacilasa, se lava. El volumen de la solución retenida se re-



ME. 1079

1 duce después a 44 ml y el producto se almacena a 4°C. La solución retenida tiene una viscosidad similar a la del enzima nativo. La actividad del complejo de Ficoll-penicilin-deacilasa se determina como sigue:

5 Se deja estabilizar a 37°C y pH 7,8, por adición de NaOH 0,1 N, una solución reguladora de fosfato (15 ml: 0,2 M-les) y bencilpenicilina (5 ml, 20 % en peso/volumen). Se añaden 2 ml de solución enzimática para iniciar la reacción. El pH de la reacción se mantiene en un valor de 7,8 por adición
10 de NaOH 0,1 N. La reacción se prosigue durante 20 minutos y se toman lecturas cada minuto.

Utilizando este procedimiento, se encuentra que el complejo enzimático deacilasa de Ficoll-penicilina retiene el 86,2 % de la actividad del enzima nativo. El contenido de proteínas del complejo enzimático de Ficoll-penicilina
15 se determina por el método de Lowry, Rosebrough, Farr y Randall (1951). Utilizando este procedimiento, se demuestra que el rendimiento de copulación global es del 87,1 %.

EJEMPLO 7

20 Se repite el Ejemplo 6 pero el pH al cual tiene lugar la copulación entre la penicilin-deacilasa y el Ficoll activado es de 10,0 en lugar de 8,5. El volumen del producto final es de 40 ml. El rendimiento de copulación global, calculado sobre la proteína retenida en la solución retenida por
25 ultrafiltración es del 78,5 %. La actividad enzimática conservada es del 74,8 %.

EJEMPLO 8

30 Se repite de nuevo el Ejemplo 6 pero el pH al cual tiene lugar la copulación entre la penicilin-deacilasa y el Ficoll activado es de 6,0. El volumen del producto final es



1 35 ml. El rendimiento de copulación global, calculado sobre la proteína retenida en la solución retenida por ultrafiltración, es del 68 %. La actividad enzimática conservada es del 56,7 %.

5 EJEMPLO 9

Estudio de reusabilidad

La solución del complejo de Ficoll-penicilin-deacilasa (4 ml = 44,4 mg de proteína), que ha sido preparada por el método del Ejemplo 6, se agrega a una solución de 6,3 g de bencilpenicilina potásica en agua y se agita a 37°C. El valor del pH de la mezcla de reacción se mantiene constante en 7,8 mediante la adición continua de NaOH 0,1 N utilizando un aparato de valoración. La reacción es completa al cabo de unas 4 horas, aunque se continúa durante 6 horas. La absorción de NaOH 0,1 N indica que el rendimiento de 6-APA es del 96,2 % del teórico. El enzima se separa de las sustancias reaccionantes de peso molecular bajo por ultrafiltración a través de una membrana cuyo límite de pesos moleculares es de 50.000. Después de lavar el enzima en la célula de ultrafiltración con agua destilada, el enzima-polímero se somete de nuevo a ultrafiltración hasta que el volumen se reduce a 150 ml. La solución retenida se reutiliza para la conversión de otro lote de 6,3 g de bencilpenicilina potásica, que se convierte en 6-APA con una eficiencia del 96,5%. Se repite todo el ciclo durante tres veces más, siendo los rendimientos de 6-APA del 92,0, 96,0 y 91,0 % del valor teórico.

25 EJEMPLO 10

30 Se llevan a 400 ml con agua destilada 18,5 ml de un complejo de Ficoll-penicilin-deacilasa que ha sido preparado por el método del Ejemplo 6 y se agita a 37°C y pH 7,8. Se



1 añaden 25 g de bencilpenicilina potásica y el pH se mantiene
constante en un valor de 7,8 mediante la adición continua
de NH_4OH 10 M. La reacción se prosigue durante 4 horas. El
enzima se separa de las sustancias reaccionantes de peso mo-
5 lecular bajo por diálisis frente a agua destilada, utilizando
un dializador de fibra hueca (Modelo DC2, Amicon Corporation,
Lexington, Mass. E.E.U.U.) con un cartucho dializante que cor-
ta el peso molecular en un valor de 50.000. La solución enzi-
mática se concentra después a 100 ml aproximadamente. La uni-
10 dad dializadora se lava a continuación con 2 partes alícuotas
de 100 ml cada una de agua destilada y éstas se reúnen con la
solución enzimática y se mantienen a 4°C entre cada experimen-
to.

15 Se realizan siete experimentos sucesivos y la eficien-
cia de hidrólisis de la bencilpenicilina potásica para formar
6-APA es del 93,2 %. La eficiencia de recuperación del enzima
es del 99,6 %, de los cuales el 2,5 % se pierde en muestras
tomadas durante cada experimento. Se agrega enzima limpio an-
tes de cada experimento para compensar cualquier pérdida.

20 EJEMPLO 11

Se realiza de acuerdo con el método descrito en el
Ejemplo 10 una hidrólisis enzimática de bencilpenicilina po-
tásica empleando un complejo de Ficoll-penicilin-deacilasa.
La reacción se prosigue durante 4 horas a pH 7,8 y 37°C . El
25 enzima se separa de las sustancias reaccionantes de peso mo-
lecular pequeño de la siguiente forma: El volumen de la mez-
cla de reacción se reduce a 40 ml aproximadamente por ultra-
filtración a través de una membrana de fibra hueca que corta
el peso molecular en 50.000. Se añaden 20 ml de agua destila-
30 da al concentrado y se repite el proceso de concentración. Se



1 reunen las dos partes alícuotas de líquido y el volumen se
reduce a 120 ml en un evaporador rotatorio a 35°C. Se añade
al concentrado un volumen igual de metil-isobutil-cetona y la
mezcla se agita fuertemente en una vasija metálica enfriada.
5 Cuando la temperatura desciende a 4°C, se añade lentamente
ácido nítrico hasta un pH de 4.3. Se continúa agitando duran-
te 30 minutos más. El 6-APA precipitado se recupera por fil-
tración, se lava con metil-isobutil-cetona, agua y acetona y
se seca durante la noche a 37°C.

10 EJEMPLO 12

Se realiza una hidrólisis enzimática de bencilpeni-
cilina potásica en la forma general descrita en el Ejemplo 10,
pero a una mayor concentración de bencilpenicilina potásica
(es decir 9 % en peso/volumen) empleando 27 g de substrato
15 en un volumen de reacción de 300 ml y siendo la concentra-
ción de enzima el doble de la utilizada en el Ejemplo 10. La
reacción se prosigue durante 4 horas a pH 7,8 y 37°C, produ-
ciéndose 6-APA con una eficiencia del 93,2 %.

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

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de ácido
6-aminopenicilánico que consiste en poner en contacto, en una
solución acuosa mantenida a un pH comprendido entre 6,0 y
25 9,0, bencilpenicilina o fenoximetilpenicilina, o una sal de
las mismas, con un complejo enzimático soluble en agua en el
que un enzima penicilin-deacilasa está combinado con un mate-
rial polimérico soluble en agua; separar después el citado
complejo enzimático de la mezcla de reacción acuosa mediante
una técnica de ultrafiltración; recuperar el ácido 6-aminope-
30

McE



1 nicilánico formado y reutilizar la solución acuosa separada
del complejo enzimático poniéndola en contacto con una nueva
cantidad de la penicilina.

5 2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, don-
de el citado complejo enzimático se forma a partir de un po-
límico soluble en agua de anhídrido maleico.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 2, don-
de el citado complejo se forma a partir de un copolímico so-
luble en agua de anhídrido maleico y éter metilvinílico.

10 4. Un procedimiento según la Reivindicación 1, don-
de el citado complejo enzimático se deriva de un polisacári-
do modificado.

15 5. Un procedimiento según la Reivindicación 4, don-
de el citado complejo enzimático se deriva de un copolímico
de sacarosa-epiclorhidrina.

6. Un procedimiento según cualquiera de las prece-
dentes reivindicaciones, donde la mezcla de reacción acuosa
en la que se produce el ácido 6-aminopenicilánico se mantiene
a un pH comprendido entre 7,0 y 8,5.

20 7. Un procedimiento según cualquiera de las prece-
dentes reivindicaciones, que se lleva a cabo de forma continua.

25 8. Un procedimiento según la Reivindicación 7, don-
de la mezcla de reacción se saca de la vasija de un reactor
y se lleva a una unidad de ultrafiltración a una velocidad
aproximadamente igual a la de adición de la solución de peni-
cilina que no ha reaccionado y donde la solución retenida en
la unidad de ultrafiltración se recicla a dicha vasija del
reactor.

30 9. Un procedimiento según la Reivindicación 8, don-
de la solución filtrada en la citada unidad de ultrafiltra-

me



1978

1 ción se introduce en una segunda vasija del reactor y desde
allí en una segunda unidad de ultrafiltración, la solución
retenida en la misma se recicla a la citada segunda vasija
del reactor y el ácido 6-aminopenicilánico se recupera de la
5 solución filtrada en la citada segunda unidad de ultrafiltra-
ción.

10 10. Un procedimiento según la Reivindicación 9,
donde se emplea una solución de bencilpenicilina a una concen-
tración de aproximadamente el 7 % en peso/volumen y los tiem-
pos de permanencia medios de la mezcla de reacción en las dos
vasijas de reactor citadas están dispuestos de manera que son
alrededor de 3 horas y 1 hora respectivamente y de tal forma
que la solución retenida en la segunda unidad de ultrafiltra-
ción citada prácticamente no contiene penicilina que no ha
15 reaccionado.

11. 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 ACIDO 6-AMINOPENI-
CILANICO.

20 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente Memoria descriptiva que consta de ~~diecinueve~~ páginas
mecanografiadas.

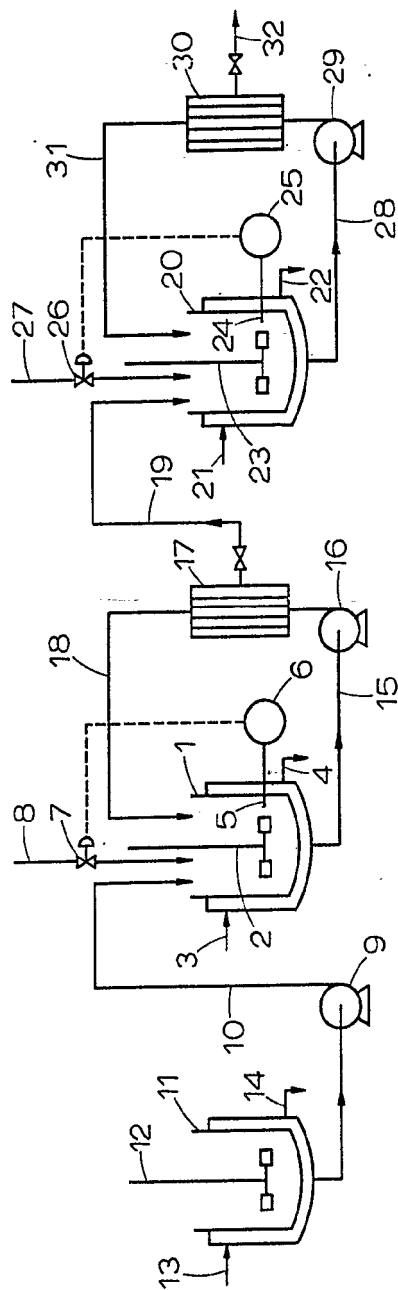
Madrid, 20 de noviembre de 1.973

BERNARDO UNGRIA
P.P.

25

mte

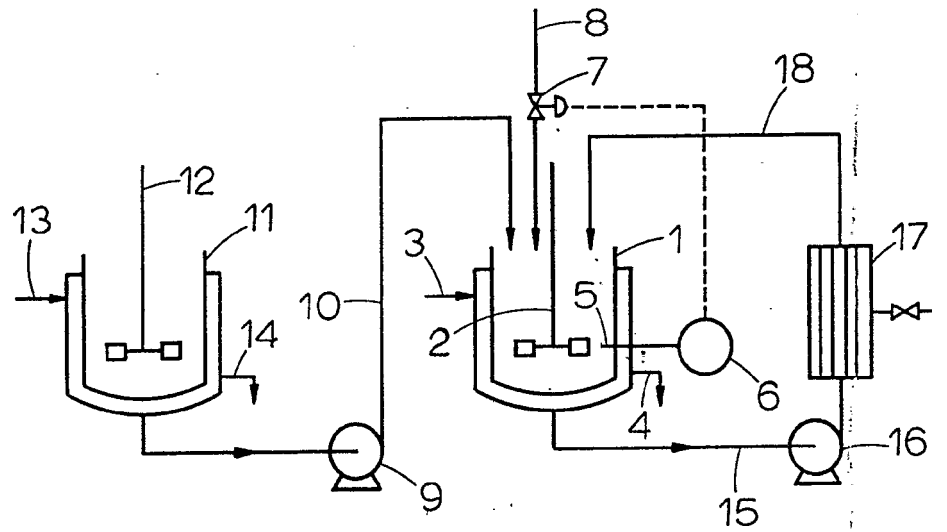
30

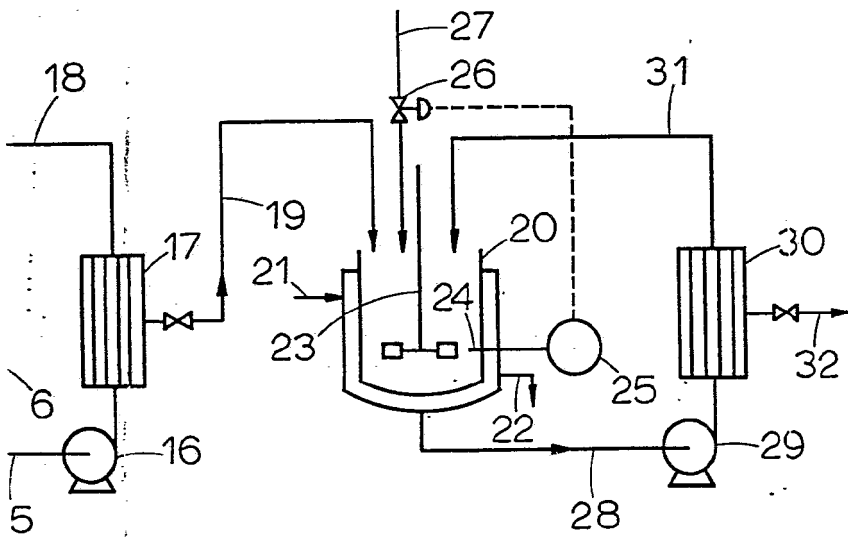


ESCALA VARIABLE
Madrid, 20 Noviembre de 1973

BERNARDO UNGRIA
P.P.







ESCALA VARIABLE
Madrid, 20 Noviembre de 1973
BERNARDO UNGRIA
P.D.