



10

P.- 56.472

B 28867 Case 5479

MEMORIA DESCRIPTIVA

422730

para solicitar PATENTE DE INVENCION en ESPAÑA por 20 años

a nombre de PFIZER INC.

entidad norteamericana

CO7D

establecida en 235 East 42nd Street, Nueva York 17,  
Nueva York, Estados Unidos de América

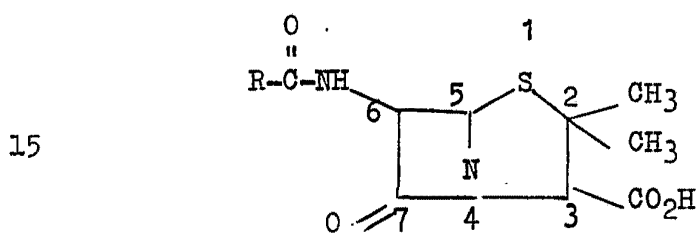
por: "UN PROCEDIMIENTO PARA AISLAR EL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO"

(Clase Internacional CO7d)



Esta invención se relaciona con un procedimiento para el aislamiento de un compuesto químico de una mezcla de reacción y, en particular con el aislamiento del ácido 6-aminopenicilánico y las sales del mismo, que son compuestos valiosos como intermedios que conducen a otras penicilinas sintéticas.

Los compuestos en el grupo que pertenece a la familia de penicilinas difieren uno del otro en la naturaleza del R variable y poseen la fórmula general que se indica a continuación



en donde la mitad de acilo en el ácido 6-aminopenicilánico se deriva de un ácido carboxílico. Las penicilinas naturales más extensamente usadas, son aquellas en donde el R variable se representa mediante bencil- (penicilina G) ó fenoximetil- (penicilina V). Aún cuando estos análogos bien conocidos son altamente antagónicos hacia los microorganismos gran-positivos, tienen



actividad gran-negativa limitada. Consecuentemente, la preparación de las penicilinas que combatirán el brote en las infecciones gran-negativas, ha recibido atención sintética considerable.

5                   La síntesis de dichas penicilinas que contienen un R variable que no sean aquellas mencionadas en lo que antecede, se efectúa a través de una condensación de un ácido o derivado del mismo con el ácido 6-aminopenicilánico o una sal del mismo, por ejemplo, tal y como se da a conocer en la patente Norteamericana Número 3.159.617. Dichos esfuerzos sintéticos requieren una fuente de material de partida, el ácido 6-aminopenicilánico, que se obtienen convenientemente, mediante hidrólisis química o enzimática de una penicilina comercial que queda disponible como un producto de fermentación.

10

15

                  La hidrólisis química de las penicilinas y en particular de la penicilina G y de la penicilina V, se da a conocer en la patente Norteamericana Número 3.499.909, en donde el ácido 6-aminopenicilánico se aísla de la mezcla de reacción enfriada como el compuesto anfotérico a un pH de 4. La formación directa del ácido 6-aminopenicilánico a través de la formación se da a conocer en la patente Norteamericana Número 3.164.604 en donde se informa que se aísla del líqui-

20

25



do de fermentación concentrado mediante adsorción inicial en una resina de intercambio de iones seguido por elución con un solvente apropiado. Las patentes Norteamericanas Números 3.144.395, 2.941.995,  
5 3.260.653, 3.239.428, 3.121.667, 3.446.705, 3.127.326, 3.239.427 y 3.622.462 todas describen la disociación enzimática de una penicilina, siendo aislado el ácido 6-aminopenicilánico resultante de la misma, mediante ajuste del pH, hasta el punto isoeléctrico induciendo de esta manera la cristalización.  
10

La patente Británica Número 896.245, da a conocer el aislamiento del ácido 6-aminopenicilánico de un líquido de fermentación acuoso mediante extracción a un pH ácido, empleando alcoholes y cetonas alifáticas que tienen de 4 a 10 átomos de carbono, mientras que la patente Norteamericana Número 3.272.715 reivindica la remoción inicial de la cadena secundaria hidrolizada de una penicilina disociada a una escala de pH de 1,5 a 3,0, seguido por el ajuste del pH hasta un valor de 3,0 a 5,0 y la concentración para inducir la cristalización.  
15  
20

Se ha descubierto ahora que en el procedimiento para aislar el ácido 6-aminopenicilánico, sus sales básicas de sodio y de potasio o su sal de adición de ácido de hidrocioruro de una solución de hidrólisis  
25



que contiene los mismos, a una concentración de 2 a 10 por ciento en peso por volumen unitario y ya sea el ácido fenilacético o el ácido fenoxiacético, que comprende los pasos de secar por rociadura la solución de hidrólisis a temperatura de 125° a 275° C., mientras que está a un pH de 2 a 8, y extraer el ácido fenilacético o el ácido fenoxiacético con un solvente orgánico no solamente es posible obtener rendimientos excelentes del ácido 6-aminopenicilánico, sino que también permitir el aislamiento directo de varias sales básicas y sales de adición de ácido del mismo, sin la necesidad de un paso de conversión costoso adicional del ácido 6-aminopenicilánico en la sal deseada. El aislamiento del ácido 6-aminopenicilánico dado a conocer anteriormente, emplea procedimientos que dan por resultado el aislamiento del material anfotérico que debe convertirse en una sal básica antes de la acilación a fin de formar una nueva penicilina.

El procedimiento de extracción mediante el cual las cadenas secundarias del ácido fenilacético o del ácido fenoxiacético que resultan de la hidrólisis de la penicilina G ó V, se separan del ácido 6-aminopenicilánico sólido o del ácido 6-aminopenicilánico en una solución acuosa solubilizando selectiva-



mente los ácidos en un solvente, es un procedimiento bien conocido para aquellas personas expertas en el ramo; el procedimiento de secado por rociadura, aún cuando se encuentra menos frecuentemente en la literatura química de los procedimientos de extracción, es también conocido para aquellas personas expertas en el ramo. El equipo y los procedimientos para el secado por rociadura han sido revisados por Kirk-Othmer, "Enciclopedia de Tecnología Química", Volumen 7, Segunda Edición, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, Nueva York, 1965, páginas 362 a 365.

Es de interés específico en el procedimiento de la presente invención, el aislamiento del ácido 6-aminopenicilánico y de las sales de adición de ácido de hidrocloruro y de las sales básicas de potasio y de sodio del mismo, a partir de la solución de hidrólisis anteriormente citada, mediante secado por rociadura a temperatura de 125° a 275° C., mientras que está a un pH de 2 a 8 y extrayendo luego el ácido fenilacético o el ácido fenoxiacético con un solvente orgánico. Es también interesante en este procedimiento, el aislamiento del ácido 6-aminopenicilánico y las sales anteriormente mencionadas del mismo, a partir de la solución de hidrólisis anteriormente mencionada, extrayendo el ácido fenilacético o



el ácido fenoxiacético, con un solvente orgánico y luego secando por rociadura a temperatura de 125° a 275° C., mientras que está a un pH de 2 a 8.

5 Como se ha mencionado anteriormente, la  
síntesis de las penicilinas no son capaces de obte-  
nerse mediante fermentación directa que emplea la  
acilación del ácido 6-aminopenicilánico con cierto  
ácido carboxílico o algún derivado del mismo. La fuen-  
te disponible del ácido 6-aminopenicilánico es me-  
10 diante hidrólisis de una penicilina, usualmente la  
penicilina G ó V, que se prepara fácilmente median-  
te procedimientos de fermentación. La hidrólisis de  
estas penicilinas puede llevarse a cabo en un número  
de maneras, siendo aquella empleada más frecuentemen-  
15 te en uso de una bacteria o de un hongo que tiene  
una enzima de acilasa de penicilina. Las células  
bacterianas o fungosas pueden dejarse enteras, o al-  
ternativamente, las células pueden romperse permitien-  
do que la enzima de hidrolización se separe de los  
20 fragmentos de la célula, mediante centrifugación. La  
enzima, liberada de los fragmentos de la célula, pue-  
de emplearse en una solución o puede fijarse mediante  
métodos físicos o químicos en un portador sólido, tal  
como un vidrio o un polímero insoluble.

25 La hidrólisis de las penicilinas que em-



plean métodos químicos ha recibido también atención  
extensa y requiere manipulaciones químicas en el gru-  
po de carboxamido que enlazan la porción de acilo con  
el ácido 6-aminopenicilánico. Las reacciones descri-  
5 tas en la patente Norteamericana Número 3.499.909  
son un ejemplo clásico de la hidrólisis de penicili-  
na mediante métodos químicos.

El aislamiento del ácido 6-aminopenici-  
lánico, que es la base de la presente invención, es  
10 el siguiente paso requerido después de la hidrólisis  
de una penicilina mediante cualesquiera de los métodos  
anteriormente mencionados. Además, en estos procedi-  
mientos el ácido 6-aminopenicilánico debe aislarse de  
una solución acuosa.

15 La primera variación preferida del pro-  
cedimiento de la presente invención consiste en secar  
por rociadura inicialmente la solución de hidrólisis  
que consiste principalmente del ácido 6-aminopenicilá-  
nico y el ácido fenilacético, si la penicilina hidro-  
20 lizada es bencilpenicilina, o del ácido fenoxiacético  
si se emplea fenoximetilpenicilina. El secado por ro-  
ciadura puede llevarse a cabo a través de una amplia  
escala de pH, a saber, entre 2 y 8. Se prefiere que el  
ácido 6-aminopenicilánico se aisle como una sal básica,  
25 y luego el secado por rociadura se lleve a cabo a un



pH de 6 a 8. Si se desea, la forma neutral o anfotérica del ácido 6-aminopenicilánico, el secado por rociadura se lleva a cabo a un pH de aproximadamente  $4 \pm 0,3$ . Además, si se desea como el producto la sal de adición de ácido del ácido 6-aminopenicilánico, se usa un pH de 2 para el secado por rociadura.

Como puede apreciarse fácilmente por una persona experta en el ramo, una selección de un pH para el secado por rociadura que queda entre 2 a  $4 \pm 0,3$  y  $4 \pm 0,3$  a 6, dará lugar a mezclas de ácido 6-aminopenicilánico y de una sal de adición de ácido del mismo y del ácido 6-aminopenicilánico y una sal básica del mismo, respectivamente.

Al preparar las sales básicas del ácido 6-aminopenicilánico en donde hay necesidad de ajustar la solución de hidrólisis a un pH de 6 a 8 mediante la adición de una base, es deseable emplear en la base el catión del cual se va a derivar la sal básica del ácido 6-aminopenicilánico. Además, cuando la penicilina inicial empleada se convierte en una sal para el objeto de solubilizarla en la reacción de hidrólisis, es deseable emplear una base que tenga el mismo catión que aquel que va a ser el catión de la sal del producto final. Se apreciará que si se emplea una base catiónica diferente para solubilizar la penicilina



5 en comparación con aquella usada para ajustar el pH hasta un valor de 8 antes del secado por rociadura, entonces es posible que se obtenga como el producto final más de una sal básica catiónica del ácido 6-aminopenicilánico. Aún cuando es apropiada cualquier base capaz de formar una sal estable con el ácido 6-aminopenicilánico, las bases preferidas para estos procedimientos anteriormente mencionados son los hidróxidos de potasio y de sodio.

10 De manera semejante, el anión del ácido que se usa para proporcionar el pH ácido antes del secado por rociadura, se convierte en el anión de la sal de adición del ácido del ácido 6-aminopenicilánico aislado final. El ácido preferido para este objeto y  
15 por lo tanto, la sal de adición de ácido preferida es aquella del ácido clorhídrico, aún cuando puede emplearse con igual éxito cualquier ácido de concentración acídica suficiente para formar una sal estable con el ácido 6-aminopenicilánico.

20 La solución de hidrólisis acuosa que se alimenta hacia el aparato de secado por rociadura puede variar a través de una amplia escala en la concentración del ácido 6-aminopenicilánico o su sal, con una concentración preferida de 2 a 10 por ciento (en  
25 peso/volumen) y se rocía en contacto con aire caliente



a temperatura de 125° a 275° C., con una escala preferida de 200 a 250° C.

Después de la vaporización del vehículo acuoso, la mezcla sólida del ácido 6-aminopenicilánico o las sales del mismo y del ácido fenilacético o fenoxiacético, dependiendo de la penicilina hidrolizada, se extrae a continuación. El solvente para la extracción puede variar y se selecciona sobre la base de la solubilidad diferencial de los ácidos fenilacético o fenoxiacético y sus sales con respecto a aquella del ácido 6-aminopenicilánico o una sal del mismo en el solvente. Cuando el secado por rociadura se lleva a cabo a un pH de 2, el ácido fenilacético o fenoxiacético se extrae de la sal de adición de ácido del ácido 6-aminopenicilánico, de preferencia el hidrocioruro. Para este objeto, se utilizan solventes tales como acetona, n-butanol, acetato de etilo, cloroformo, acetato de butilo y benceno; los solventes preferidos son acetato de etilo y n-butanol. Cuando el secado por rociadura se lleva a cabo a un pH de 4, el solvente preferido para la extracción del ácido fenilacético o fenoxiacético del ácido 6-aminopenicilánico anfotérico es la cetona de metilisopropilo, y en el secado por rociadura a un pH de 6 a 8 el solvente preferido para la extracción de la sal básica del



ácido fenilacético o fenoxiacético de la sal básica del ácido 6-aminopenicilánico es una mezcla de 95 por ciento de acetona y 5 por ciento de agua.

5                   Después de la remoción de la cadena secundaria del ácido mediante extracción, el ácido 6-aminopenicilánico residual puede purificarse adicionalmente si se desea, o puede emplearse en reacciones subsecuentes, en donde se copula con algún sustrato del ácido apropiado proporcionando de esta manera una penicilina sintética.

10

                  La segunda modalidad preferida del procedimiento de la invención presente, consiste de la extracción inicial de las cadenas secundarias del ácido anteriormente mencionado, seguido por secado por rociadura a un pH de 2 a 8.

15

                  La solución de hidrólisis, después de la disociación de la penicilina G ó V requerida, se ajusta primero a un pH de 2, de preferencia con ácido clorhídrico y el ácido fenilacético o fenoxiacético se extrae de la misma con un solvente inmisible en agua; los solventes preferidos para dicha extracción son acetato de amilo ó n-butanol. Son apropiados también otros solventes tales como acetato de etilo, cloroformo, el cloruro de metileno, benceno o tolueno.

20

25                   Después de extraerse la cadena secundaria,



la solución restante que contiene el ácido 6-aminopenicilánico se seca por rociadura a un pH de 2, ó alternativamente el pH puede ajustarse hasta un pH más básico empleando una solución básica y secándose por rociadura subsecuentemente. La solución básica que se selecciona no es crítica y se prefiere el hidróxido de sodio o de potasio. Cuando el secado por rociadura se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 4, el ácido 6-aminopenicilánico se aísla como la forma neutral o de zwitterión. Correspondientemente, el secado por rociadura a un pH básico, proporciona la manera de aislar las sales básicas del ácido 6-aminopenicilánico.

El ácido 6-aminopenicilánico que resulta de esta modalidad preferida de la presente invención, tal y como se ha mencionado con anterioridad, puede purificarse además o puede utilizarse en la preparación de otras penicilinas.

En la primera variación preferida del procedimiento presente, en donde la solución de hidrólisis se seca por rociadura a un pH de 2 a 8 y luego se extrae el ácido fenilacético o el ácido fenoxiacético, se prefiere además que la solución se seque por rociadura a un pH de 6 a 8 cuando el solvente de extracción es acetona acuosa al 95 por ciento, que la solución se seque por rociadura a un pH de 4, cuando el solvente de



extracción es cetona de metilisopropilo y que la solución se seque por rociadura a un pH de 2, cuando el solvente de extracción es acetato de etilo.

5                   En la segunda variación preferida del procedimiento presente, en donde la solución de hidrólisis se trata extrayendo el ácido fenilacético o el ácido fenoxiacético y luego secando por rociadura a un pH de 2 a 8, se prefiere además emplear n-butanol como el solvente de extracción y luego secar por rociadura a un pH de 7; emplear acetato de amilo como el solvente de extracción y secar por rociadura a un pH de 2 y emplear cetona de metilisopropilo como el solvente de extracción y secar por rociadura a un pH de 4.

15                   Se proporcionan los siguientes ejemplos solamente o para el objeto de ilustrar la invención y no deben interpretarse como limitaciones de la misma, siendo posibles muchas variaciones de la misma, sin desviarse del espíritu ni alcance de la invención.

20

EJEMPLO 1

25                   A una suspensión de 26,7 gramos de células de Proteus rettegeri ATCC 9250 en 1500 mililitros de agua se añaden 80 gramos de bencilpenicilina de so-



5            dio. La mezcla se lleva a un pH de 8,0 y se agita a  
temperatura de 37° C., durante 10 horas, manteniendo  
el pH a un valor de 8,0 mediante la adición periódica  
de una solución acuosa de hidróxido de sodio de  
10            concentración 2N. El material de la célula se separa  
de la mezcla de reacción mediante filtración, para  
proporcionar una solución cristalina. La solución re-  
sultante se seca por rociadura para proporcionar 92,4  
gramos de un sólido que consiste principalmente del  
15            ácido 6-aminopenicilánico de sodio y el fenilacetato  
de sodio. El material sólido se extrae (dos veces 750  
mililitros) con acetona al 95 por ciento para disol-  
ver el fenilacetato de sodio. Los sólidos resultantes  
se filtran, se lavan con acetona y se secan para pro-  
20            porcionar 58,2 gramos del producto que consiste de 80  
por ciento del ácido 6-aminopenicilánico de sodio se-  
gún ensayo.

#### EJEMPLO 2

20            El ácido 6-aminopenicilánico de sodio se  
aisla en rendimiento comparable y pureza comparable,  
siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, a partir de  
27 gramos de E. coli ATCC 9637 y 83,6 gramos de bencil-  
25            penicilina de sodio.



EJEMPLO 3

5 El ácido 6-aminopenicilánico de sodio se  
le aísla en un rendimiento y pureza comparable, si-  
guiendo el procedimiento del Ejemplo 1, a partir de  
28 gramos de células de Aspergillus flavus Link ATCC  
13608 y 84,0 gramos de fenoximetilpenicilina de sodio.

EJEMPLO 4

10 Las células de Proteus rettgeri ATCC  
9250 se rompen en un baño ultrasónico, la mezcla se  
centrifuga y el líquido sobrenadante cristalizado se diali-  
za y se liofiliza para proporcionar la acilasa de peni-  
15 cilina cruda. A una solución de 2,0 gramos de la enzi-  
ma en 150 mililitros de agua, se añaden 8,0 gramos de  
la bencilpenicilina de potasio. La solución resultant-  
te se agita a temperatura de 37° C., durante de 10 a  
20 horas, con el control del pH a un valor de 8,0 me-  
diante la adición cuidadosa de una solución acuosa de  
hidróxido de potasio de concentración 2N. La solución  
se translada a una unidad de ultrafiltración y se per-  
mite pasar a través de una membrana semipermeable, ba-  
jo presión de nitrógeno. La solución esencialmente exen-  
25 ta de proteína resultante, se seca por rociadura como



en el Ejemplo 1 y los sólidos resultantes se liberan del fenilacetato de potasio mediante extracción con acetona al 95 por ciento dejando el potasio-6-amino-penicilinato crudo deseado en un buen rendimiento.

5

#### EJEMPLO 5

Se repite el procedimiento del Ejemplo 4 a partir de 2,0 gramos de enzima de acilasa de penicilina de E. coli, y ATCC 9637, y 8,4 gramos de bencilpenicilina de potasio para proporcionar el 6-aminopenicilinato de potasio.

10

#### EJEMPLO 6

15

Se repite de nuevo el procedimiento del Ejemplo 4, a partir de células de Aspergillus flavus, Enlace ATCC 13608 y fenoximetilpenicilina de potasio, para proporcionar el producto deseado.

20

#### EJEMPLO 7

25

La acilasa de penicilina de Proteus rettgeri ATCC 9250 se inmoviliza sobre vidrio poroso de acuerdo con el procedimiento proporcionado en la patente Nor-



teamericana Número 3.556.945. Este material se añade  
a una solución al 4 por ciento de bencilpenicilina  
de potasio en cantidades suficientes para completar  
la reacción hidrolítica en de 12 a 18 horas a tempe-  
5 ratura de 37° C., y un pH de 8,0. La mezcla de reac-  
ción se filtra para proporcionar una solución crista-  
lina y un material de enzima sólido que puede reutili-  
zarse. La solución cristalina a un pH de 8,0 se seca  
por rociadura y el fenilacetato de potasio se extrae  
10 de los sólidos empleando acetona al 95 por ciento, de-  
jando el 6-aminopenicilanoato de potasio.

De manera semejante, la acilasa de E. coli  
ATCC 9637, puede substituírse por Proteus rettgeri  
ATCC 9250 con resultados semejantes.

15

#### EJEMPLO 8

Se obtienen resultados semejantes a aque-  
llos del Ejemplo 7, cuando se repite el procedimiento  
20 empleando la acilasa de penicilina de Aspergillus fla-  
vus Enlace ATCC 13608, y la fenoximetilpenicilina de  
potasio.

25

#### EJEMPLO 9

A una mezcla de 45 gramos de bencilpeni-



5 cilina de potasio en 200 mililitros de cloruro de metileno, se añaden 32 mililitros de N,N-dimetilanilina. A esta suspensión agitada, se añaden por gotas 12 mililitros de diclorosilano de dimetilo a través de un período de 30 minutos, manteniendo la temperatura a menos de 30° C. La mezcla se enfría a temperatura de -50° C., y se añaden 27 gramos de pentacloruro de fósforo, todo a la vez y la mezcla se agita a temperatura de -40° C., durante 2 horas y luego se enfría a temperatura de -65° C. A esta mezcla se añaden 6,4 mililitros de N,N-dimetilanilina y 200 mililitros de n-butanol, manteniendo la temperatura a menos de -40° C. La mezcla se agita vigorosamente a temperatura de -40° C., durante 3 horas, se deja luego calentar a temperatura ambiente a través de cuyo período de tiempo se añaden 250 mililitros de agua destilada, con agitación continua. El ácido fenilacético se extrae en la capa de n-butanol y la fase acuosa se ajusta a un pH de 8,0 con una solución acuosa de hidróxido de potasio de concentración 2N y se seca por rociadura. Los sólidos, en cantidad de 47,4 gramos, están constituidos de 6-aminopenicilinato de potasio al 75 por ciento.

10

15

20

25 Se obtienen resultados semejantes cuando la fenoximetilpenicilina de potasio se substituye por la bencilpenicilina de potasio.



#### EJEMPLO 10

Una solución al 5 por ciento de bencil-  
penicilina de potasio se trata como en el Ejemplo 5,  
5 para generar una solución filtrada cristalina a un pH  
de 8,0. La solución se ajusta a un pH de 4,0 con ácido  
clorhídrico de concentración 6N y se seca por rociadu-  
ra. El sólido de color amarillo claro resultante se  
forma en una suspensión espesa varias veces en cetona  
10 de metilisopropilo para remover el ácido fenilacético,  
y se filtra luego y se seca para proporcionar un buen  
rendimiento del ácido 6-aminopenicilánico.

#### EJEMPLO 11

15 De manera semejante al Ejemplo 5, se aña-  
den 75 gramos de vidrio poroso en el cual se ha inmo-  
vilizado la acilasa de penicilina de A. flavus Enlace  
ATCC 13608 a 1 litro de una solución acuosa al 3 por  
20 ciento de fenoximetilpenicilina de potasio y la mezcla  
se agita levemente durante 18 horas, a temperatura de  
37° C., y un pH de 8,0. La solución filtrada cristali-  
na se ajusta a un pH de 2 con ácido clorhídrico de con-  
centración 6N y se seca por rociadura para proporcionar  
25 un sólido ligeramente amarillo. El ácido fenoxiacético



se extrae de los sólidos secados por rociadura usando acetato de etilo y los sólidos restantes se filtran para proporcionar el hidrocloreuro del ácido 6-aminopenicilánico crudo.

5

#### EJEMPLO 12

Una solución acuosa al 7 por ciento (1500 mililitros) de bencilpenicilina de potasio se trata con 300 gramos de vidrio poroso en donde se inmoviliza la acilasa de penicilina de Proteus rettgeri ATCC 9250. Después de que la mezcla resultante se ha agitado levemente durante 20 horas a temperatura de 37° C., y un pH de 8,0, la enzima fijada se recupera mediante filtración y el filtrado resultantes se ajusta a un pH de 2 con ácido clorhídrico de concentración 6N. El ácido fenilacético se extrae con acetato de amilo y la fase acuosa se seca por rociadura para proporcionar el hidrocloreuro del ácido 6-aminopenicilánico sólido.

20

#### EJEMPLO 13

A 1000 mililitros de una solución acuosa al 5 por ciento de fenoximetilpenicilina de potasio,

25

21.1.74



se añaden 120 gramos de vidrio poroso en donde se in-  
moviliza la acilasa de penicilina de Aspergillus fla-  
vus Enlace ATCC 13608. La mezcla, después de agitarse  
levemente durante 18 horas a temperatura de 37° C.,  
5 y un pH de 8,0, se filtra y el filtrado se ajusta a  
un pH de 2 con ácido clorhídrico de concentración 6N.  
El ácido fenoxiacético se extrae subsecuentemente con  
n-butanol, y la capa acuosa se ajusta a un pH de 4,0  
con una solución de hidróxido de sodio y se seca por  
10 rociadura para proporcionar el ácido 6-aminopenicilá  
nico crudo.

#### EJEMPLO 14

15 A una solución de 2,0 gramos de acilasa  
de penicilina en 150 mililitros de agua, que se prepa-  
ra tal como en el Ejemplo 3, se añaden 75 gramos de  
bencilpenicilina de potasio. La mezcla de reacción se  
agita durante 18 horas, a temperatura de 37° C., mien-  
20 tras que el pH se mantiene a un valor de 8,0 mediante  
la adición periódica de hidróxido de potasio acuoso  
de concentración 2N. La solución se hace pasar a tra-  
vés de una membrana semipermeable bajo una presión de  
nitrógeno, y el filtrado se ajusta a un pH de 2 con  
25 ácido clorhídrico de concentración de 6N. El ácido fe-



5 nilacético se extrae con cetona de metilisopropilo y la capa acuosa se ajusta a un pH de 7 con hidróxido de potasio de concentración  $4N$  y se seca por rociadura. Los sólidos secados por rociadura, que consisten principalmente de 6-aminopenicilinato de potasio crudo, se recogen subsecuentemente.

#### EJEMPLO 15

10 Una solución al 2 por ciento de fenoximetilpenicilina de potasio se hace reaccionar de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 8, y la mezcla de reacción filtrada a pH de 8,0 se seca por rociadura. El sólido cristalino resultante se extrae con metanol frío para remover el fenoxiacetato de potasio. Los sólidos se filtran para proporcionar el 6-aminopenicilinato de potasio crudo, en un buen rendimiento.

#### EJEMPLO 16

20 Se sigue el procedimiento del Ejemplo 7, a partir de una solución acuosa al 4 por ciento de benzilpenicilina de sodio. Después de filtrar la mezcla de reacción, el filtrado se ajusta a un pH de 4,0 con ácido clorhídrico de concentración  $6N$  y se seca por ro-



ciadura subsecuentemente. Los sólidos secados por rociadura color blanco se extraen con cetona de metiliso propilo, dejando, después de la filtración, el producto deseado, el ácido 6-aminopenicilánico.

5

EJEMPLO 17

Una solución al 4 por ciento de fenoximetilpenicilina de sodio se trata tal como en el Ejemplo 8, para generar una solución filtrada cristalina. La solución se ajusta a un pH de 4,0 con ácido clorhídrico de concentración 6N y se seca por rociadura para proporcionar un sólido blanco. El sólido se forma en una suspensión espesa varias veces en cetona de metilisopropilo, se filtra y se seca para proporcionar un buen rendimiento del ácido 6-aminopenicilánico.

10

15

EJEMPLO 18

20

25

Una solución al 3 por ciento de fenoximetilpenicilina de potasio se trata tal como en el Ejemplo 8, para generar una solución filtrada cristalina. La solución se ajusta a un pH de 2,0 con ácido clorhídrico de concentración 6N y se seca por rociadu-



ra para proporcionar un sólido de color amarillo claro. El sólido, que se forma en una suspensión espesa varias veces en acetato de butilo para disolver el ácido fenoxiacético, se filtra y se seca para proporcionar un buen rendimiento del hidrocloreuro del ácido 6-aminopenicilánico.

EJEMPLO 19

Una solución al 4 por ciento de bencilpenicilina de potasio, se trata tal como en el Ejemplo 4 para generar una solución cristalina. La solución se ajusta hasta un pH de 2,0 con ácido clorhídrico de concentración 6N y se extrae dos veces con acetato de etilo. La capa acuosa resultante se seca por rociadura a un pH de 2,2 para proporcionar un buen rendimiento del hidrocloreuro del ácido 6-aminopenicilánico.

EJEMPLO 20

Una solución al 4 por ciento de bencilpenicilina de sodio se trata tal como en el Ejemplo 7, usando una solución de hidróxido de sodio de concentración 2N para mantener constante el pH a un valor de 8,0,



a fin de generar una solución filtrada cristalina. La solución se ajusta a un pH de 2,1 con ácido clorhídrico de concentración  $6N$  y se extrae varias veces con cetona de metilisopropilo. La capa acuosa resultante se ajusta a un pH de 7,3, con hidróxido de sodio de concentración  $4N$  y se seca por rociadura para proporcionar un buen rendimiento del 6-aminopenicilinato de sodio.

10

#### EJEMPLO 21

Una solución al 5 por ciento de fenoximetilpenicilina de sodio, se trata tal como en el Ejemplo 8 para generar una solución filtrada cristalina. La solución se ajusta a un pH de 2 con ácido clorhídrico de concentración  $6N$  y se extrae con butanol. La fase acuosa se separa, se ajusta a un pH de 4, con una solución de hidróxido de sodio y se seca por rociadura para proporcionar el ácido 6-aminopenicilánico crudo.

20

La presente solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, el día 23 de Febrero de 1973, bajo el número 335.435, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial

25

21.1.74



## REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Un procedimiento para aislar el ácido 6-aminopenicilánico, sus sales básicas de sodio y de potasio o su sal de adición de ácido de hidrocloruro de una solución de hidrólisis que contiene el mismo a una concentración de 2 a 10 por ciento en peso por volumen unitario y ya sea el ácido fenilacético o el ácido fenoxiacético, caracterizado por los pasos de secar por rociadura la solución de hidrólisis a temperatura de 125º a 275º C., mientras que está a un pH de 2 a 8 y extraer el ácido fenilacético o el ácido fenoxiacético con un solvente orgánico.

15

20

25

2ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 1ª, caracterizado por secar por rociadura la solución de hidrólisis a temperatura de 125º a 275º C., a un pH de 2 a 8 y extraer luego el ácido

21.1.74

- 27 -

*ME*



fenilacético o el ácido fenoxiacético con un solvente orgánico.

5                   3ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 1ª, caracterizado por extraer el ácido fenilacético ó el ácido fenoxiacético con un solvente orgánico y luego secar por rociadura la solución de hidrólisis a temperatura de 125º a 275º C., mientras que está a un pH de 2 a 8.

10                   4ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 2ª, caracterizado por el hecho de que la solución se seca por rociadura a un pH de 6 a 8.

15                   5ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 4ª, caracterizado por el hecho de que el ácido fenilacético o el ácido fenoxiacético se extrae con acetona acuosa al 95 por ciento.

6ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 2ª, caracterizado por el hecho de que la solución se seca por rociadura a un pH de 4.

20                   7ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 6ª, caracterizado por el hecho de que el ácido fenilacético o el ácido fenoxiacético se extrae con cetona de metilisopropilo.

25                   8ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 2ª, caracterizado por el hecho de que

M/E

la solución se seca por rociadura a un pH de 2.

5 9ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 8ª, caracterizado por el hecho de que el ácido fenilacético o ácido fenoxiacético se extrae con acetato de etilo.

10 10ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 3ª, caracterizado por el hecho de que el ácido fenilacético o el ácido fenoxiacético se extrae con n-butanol.

11ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 10ª, caracterizado por el hecho de que el secado por rociadura es a un pH de 7.

15 12ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 3ª, caracterizado por el hecho de que el ácido fenilacético o el ácido fenoxiacético se extrae con acetato de amilo.

13ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 12ª, caracterizado por el hecho de que el secado por rociadura es a un pH de 2.

20 14ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 3ª, caracterizado por el hecho de que el ácido fenilacético o el ácido fenoxiacético se extrae con cetona de metilisopropilo.

25 15ª.- El procedimiento de conformidad con la reivindicación 14ª, caracterizado por el hecho de



29



que el secado por rociadura es a un pH de 4.

16ª.- Un procedimiento para aislar el ácido 6-aminopenicilánico

5 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 29 ENE. 1974  
P.A. Fernando de Elizaburu  
Por Poder. *[Signature]*

21.1.74

JGA.

*[Handwritten initials]*