

Manc 1573/

52

Dott. MARIO STEFANINI

Research Fellow Institute of International Education - Milwaukee (Visc.)

46
53

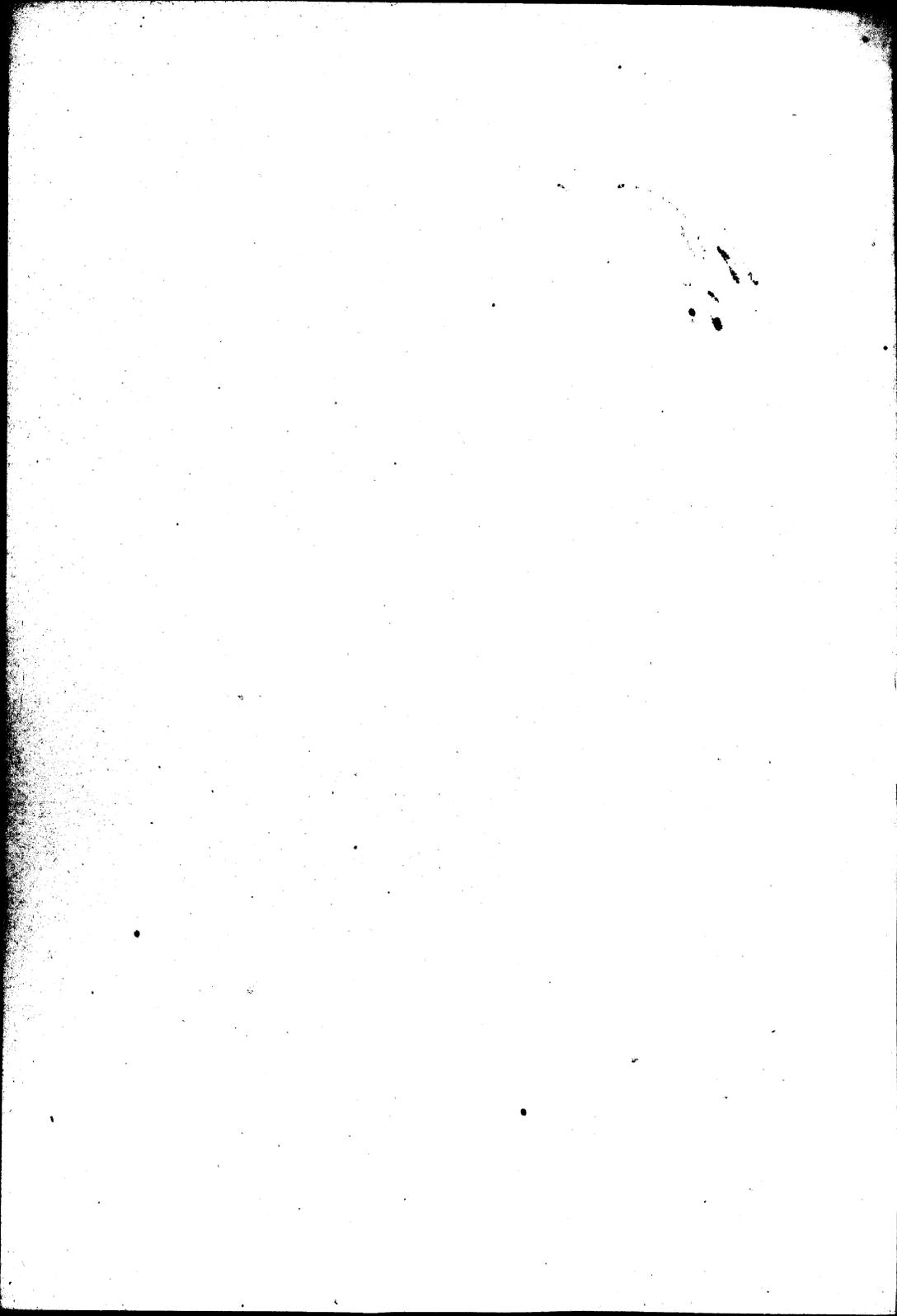


SINTESI ED ISOLAMENTO DELLA BENZILPENICILLINA

Estratto da «CLINICA NUOVA»
Ottobre-Novembre 1946 A. II - N. 10-11

«CLINICA NUOVA»

RASSEGNA DEL PROGRESSO MEDICO INTERNAZIONALE
DIREZIONE, REDAZIONE, AMMINISTRAZIONE
ROMA - VIALE XXI APRILE, 13 - TEL. 82458



Poco dopo la scoperta dell'attività antibiotica della penicillina le prime ricerche chimiche tese all'isolamento del prodotto sintetico allo stato cristallino permisero di concludere per una sua struttura ossazolono-tiazolidinica. Fu anche presto dimostrato che composti di questo tipo (fig. A) potevano essere ottenuti con una certa facilità condensando un ossazolone con gruppo aldeidico libero (fig. B) con un acido α -amino β -mercapturico, la d-penicillamina (fig. C) (1), normalmente presente nella penicillina naturale.

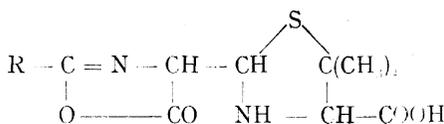


FIG. A

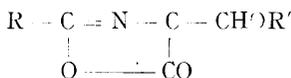


FIG. B

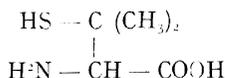


FIG. C

Un certo numero di questi composti, ottenuti tutti impiegando come ossazolone l'azolactone o 2-benzil-4-metaossimetilen-5 (4) ossazolone, dimostrarono di aver una debole attività antibiotica. Così (2) dalla reazione

Secondo la più recente nomenclatura consigliata dall'Accademia delle Scienze Americana, la penicillina G viene denominata benzilpenicillina; la K, n-epitipenicillina; la F, O₂-pentilpenicillina e la X, p-idrossibenilpenicillina.

dell'azolactone con la d(+)penicillamina cloridrato fu ottenuto un composto contenente in 1 mgr. 0,5 unità di attività benzilpenicillinica. Con indipendenti ricerche, chimici e biologi inglesi (3), studiando la possibilità di ottenere un composto ad attività antibiotica dalla reazione della dl-penicillamina con il 2-steril4-etossimetilen-5 (4) ossazolone, ottennero ugualmente un debole antibiotico condensando a freddo in acido acetico glaciale contenente acetato di sodio. I 2 composti dimostrarono che se veniva impiegata la penicillina levogira invece della destrogira il prodotto ottenuto era privo di attività antibiotica.

Così scarsa era l'attività in vitro di questi composti che era giusto chiedersi se la loro azione antibiotica fosse veramente dovuta alla presenza di una struttura penicillinica o piuttosto ad una azione antibiotica generica e debole che molti composti, anche molto lontani chimicamente dalla penicillina, presentano in vitro. Fu presto raggiunta la prova che i prodotti sintetici ottenuti contenevano penicillina.

Misture sintetiche e benzilpenicillina dimostrarono comparativamente la stessa stabilità di fronte a vari agenti chimici (alcol metilico, diazometano ecc.) e la stessa attività antibiotica (relativamente alla quantità presente di principio attivo) di fronte a sette differenti ceppi batterici (4). Ulteriore evidenza fu ottenuta mediante tecniche impieganti solo radioattivo nella molecola della d-penicillamina (5); dimostrando che benzilpenicillina e misture sintetiche hanno eguali coefficienti di distribuzione in differenti solventi (6-m) e presentavano uguali bande di assorbimento nella regione dell'infrarosso a $5,63 \mu$ (6). Due ultime prove biologiche confermarono la presenza di vera benzilpenicillina nelle misture sintetiche: l'eguale eliminazione nel coniglio e la distruzione dell'attività antibiotica nei due composti da parte della penicillinasi (7).

Si tentò di ottenere una purificazione delle misture sintetiche che permettesse di raggiungere una ragionevole azione antibiotica (si ricordi che l'attività minima consentita per il sale sodico della benzopenicillina naturale è di 1,667 unità per mgr. di peso). Variando le condizioni sperimentali in cui avveniva la reazione della d-penicillamina e dell'azolactone si giunse ad ottenere composti di attività pari ad unità 3,6 per mgr.

Tecniche completamente nuove permisero più tardi di ottenere misture assai più attive.

Così con un metodo di partizione cromatografica su silicio a pH 7 l'attività della mistura sintetica fu portata a 44 unità/mgr. (9) e con il metodo del frazionamento per « distribuzione contro corrente (9) » l'attività media fu portata a 30-50 unità/mgr. con rari risultati sino a 275 unità/mgr. (6).

La soluzione del problema è stata raggiunta recentemente da Du Vigneaud e coll. (10) che sono riusciti ad isolare benzilpenicillina sintetica

dalla mistura ottenuta con la reazione di d-penicillamina ed azoactone, allo stato di sale di trietilammonio.

Una tecnica completamente nuova è stata la base di questo risultato favorevole che apre nuove possibilità nel campo degli antibiotici. Mescolando in quantità equimolecolari cloridrato di d-penicillamina e azoactone in piridina contenente trietilamina, il prodotto che si ottiene è privo di attività antibiotica, che però riacquista se viene trattato a caldo con piridina contenente cloruro di piridio. Questo prodotto non contiene tracce dei reagenti di partenza ed è particolarmente ben frazionabile con il metodo della « distribuzione contro corrente » preceduto dall'estrazione della benzilpenicillina in soluzione cloroformica in tampone fosfato 1,31 M. a pH 5,2. Successive purificazioni mediante soluzione in cloroformio e successiva estrazione in tampone fosfato 2 M a pH 4,88 permettono di ottenere cristalli di benzilpenicillina trimetilammonio che possono essere ulteriormente purificati con lavaggio in etere ed acetone. Questi cristalli presentano punto di fusione, spettri di assorbimento nel campo dell'ultravioletto e dell'ultravioletto, indice di rifrazione ed attività antibiotica in vitro uguali a quelli del sale di trietilammonio della penicillina naturale.

Quali sono gli sviluppi della sensazionale scoperta è difficile dire: dal punto di vista chimico l'isolamento di questa penicillina sintetica costituisce un indizio ma non una prova di valore assoluto della struttura della penicillina. Dal punto di vista pratico indubbiamente, quando si sia effettivamente dimostrato con lunga esperienza in vivo l'identità di azione antibiotica tra benzilpenicillina naturale e sintetica, la preparazione di P. sintetica risolverà il problema degli enormemente costosi impianti che sinora hanno rappresentato un ostacolo insormontabile ai paesi poveri per la propria produzione di penicillina.

Dal laboratorio dell'università di Cornell la penicillina sintetica è passata ora nelle mani dei clinici a cui spetta l'ultima parola sulla attività terapeutica. Ma già nuovi sviluppi nella chimica degli antibiotici permettono di pensare che presto nuove armi terapeutiche saranno impiegabili. È stato dimostrato che è possibile ottenere piccole quantità di penicillina non solo partendo dalla d-penicillamina (che è normalmente presente nella P. naturale) ma anche partendo da altri acidi α -amino- β -mercapturici come la d-cisteina, le tiotreonine, la mercaptotoleucina (11). L'ulteriore purificazione e l'isolamento in forma cristallina di queste nuove penicilline potrebbe rappresentare per la penicillina quanto già avvenne per i sulfamidici: la scoperta di varietà particolarmente attive di fronte a particolari ceppi e specie batteriche e quindi di enorme valore pratico per il loro impiego terapeutico.

AUTORI CITATI

1. Abraham E. P., Chain E., Baker W., Conforth J. W., Robison R. - *Report to Medical Research Council*, 4 ottobre 1934.
2. Merck and Co. - *Report*, 31 gennaio 1944.
3. Robison G. M., Abraham E. P., Baker W., Chain E., Robison R. - *Report to Medical Research Council*, 27 marzo 1944.
4. Department of Biochemistry Cornell University. - *Report to the Committee for Medical Research*, 1 marzo 1945.
5. Department of Biochemistry Cornell University. - *Report to the Committee for Medical Research*, 1° novembre 1945.
6. Department of Biochemistry Cornell University. - *Report to the Committee for Medical Research*, 15 dicembre 1945.
7. Abraham E. P., Baker W., Chain E., Robison R. - *Report to the Medical Research Council*, 26 novembre 1945.
8. The Union Company. - *Report*, 30 novembre 1945.
9. Craig L. C. - *J. Biol. Chem.*, 155, 519, 1944.
10. du Vigneaud V., Carpenter F. H., Holley R. W., Livermore A. H., Rachele J. R. - *Science*, 104, 431, 1946.
11. Department of Biochemistry Cornell University Medical College. - *Report to the Committee for Medical Research*, 1° dicembre 1945.

354161

