



28

354384

# MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un<sup>a</sup>

PATENTE DE INVENCION .

SOLICITANTE: BEECHAM GROUP LIMITED

RESIDENCIA: Beecham House, Great West Road,

BRENTFORD. Middlesex, Inglaterra.

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARA-

CION DE UN ANTIBIOTICO DE TETRACI-

CLINA HIPOALERGENICO".

Prioridad: Patente británica n.º 25291/67 del 1-6-67

R/G.

28 MAR



1 Este invento se refiere a antibióticos y en especial  
a nuevos antibióticos de renovada utilidad, que de aquí en  
adelante denominaremos antibióticos hipoalergénicos. Por el  
término "antibiótico hipoalergénico" se entiende un antibió-  
5 tico que no sensibiliza a un individuo previamente no sensi-  
ble y que es menos probable que produzca una respuesta alér-  
gica, por ejemplo anafiláctica, en un individuo previamente  
sensibilizado.

10 Una de las reacciones adversas de estos antibióticos  
es su capacidad de hipersensibilización. Esta hipersensibili-  
zación produce el cuadro familiar de la alergia, tal como  
urticaria, enfermedad del suero o incluso shock anafiláctico.

15 Un objeto del presente invento es proporcionar ciertos  
antibióticos y sus sales y derivados en una forma que esté  
exenta de material antígeno y que no produzca reacciones ana-  
filácticas en sujetos previamente sensibilizados y no cause  
sensibilización en las personas que previamente no estaban  
sensibilizadas al antibiótico apropiado.

20 Por consiguiente, el presente invento proporciona un  
antibiótico de tetraciclina hipoalergénico o una sal o deri-  
vado no tóxicos del mismo, constituido por una forma comer-  
cial de dicho antibiótico, o dicha sal o derivado del mismo  
no tóxicos, de los que se ha eliminado el material antígeno  
de elevado peso molecular que se encuentra inherentemente  
25 presente en el antibiótico o en la sal o derivado no tóxicos  
del mismo, realizándose la eliminación durante la manufac-  
tura del antibiótico o después.

30 En el sentido utilizado aquí, el término "antibióti-  
co de tetraciclina" se refiere a compuestos tales como te-  
traciclina, clorotetraciclina, desmetiltetraciclina, oxite-



1 traciiclina y desmetilclorotetraciiclina. Sus sales no tóxicas  
comprenden las sales con ácidos inorgánicos y orgánicos y sus  
derivados incluyen los antibióticos terapéuticos del tipo co-  
nocado, tales como las bases de Mannich.

5 Debe entenderse que los antibióticos comerciales se  
preparan por procedimientos de fermentación en la forma ha-  
bitual o por modificación química posterior de este tipo de  
material. El material antígeno de elevado peso molecular pue-  
de ser separado del antibiótico ya sea como una operación adi-  
10 cional durante el aislamiento o bien tratando el antibiótico  
aislado. Análogamente, cuando se prepara un derivado o una  
sal del antibiótico, el antibiótico de partida puede encon-  
trarse en forma purificada o bien puede purificarse el produc-  
to final.

15 El material antígeno está constituido fundamentalmente  
por polipéptidos de elevado peso molecular y material  
proteínáceo y este material no es separado en los procesos  
normalmente utilizados en el aislamiento y purificación del  
antibiótico.

20 La purificación del antibiótico para dar un material  
hipoalergénico se realiza por métodos basados en las diferen-  
cias de peso molecular o de dimensiones y comprende el uso  
de la filtración en estado de gel o diálisis o de membranas  
para hiperfiltración, siendo las membranas de origen sinté-  
25 tico, natural o natural modificado, optativamente con grupos  
funcionales polielectrolíticos.

30 Un procedimiento especialmente adecuado es la filtra-  
ción en estado de gel que implica el uso de un tamiz molecu-  
lar que es un dextrano modificado obtenido por fermentación  
del azúcar, en el que las macromoléculas lineales de dextrano



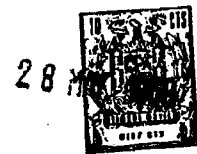
1 están reticuladas para dar una red tridimensional de cade-  
nas polisacáridas. Un material adecuado es el conocido co-  
mercialmente con el nombre de Sephadex. Otro tamiz molecu-  
lar adecuado es un gel de poliacrilamida conocido con el  
5 nombre de Biogel.

La presencia del contaminante en el antibiótico de par-  
tida puede ser detectada dializando el material con agua co-  
rriente para separar el antibiótico, concentrando la solu-  
ción del retentato, hidrolizándolo y después analizando los  
10 aminoácidos resultantes por cromatografía en una columna can-  
biadora de ión. Por este procedimiento puede demostrarse  
que, mientras que el antibiótico impurificado después de la  
diálisis e hidrólisis produce un cierto número de los amino-  
ácidos comúnmente encontrados en las proteínas, después de  
15 la purificación no se obtiene estos aminoácidos, sino sola-  
mente cualquier compuesto amínico que pueda ser producido  
por descomposición del propio antibiótico. Otro método con-  
siste en someter el contaminante aislado al ensayo de anafi-  
laxis cutánea pasiva (ensayo ACP) en animales adecuadamente  
20 sensibilizados.

Los siguientes ejemplos ilustran el invento.

EJEMPLO 1

Una muestra de 10 g. de hidrocloreuro de tetraciclina  
comercial se disuelve en agua y la solución se coloca en  
una bolsa de diálisis de acetato de celulosa y se dializa  
25 exhaustivamente frente a agua corriente durante 5 días. El  
retentato contenido en la bolsa se seca por congelación y  
se utiliza una parte para un ensayo ACP en cobayas adecuada-  
mente sensibilizados, apareciendo una respuesta de roncha y  
eritema que indica una interacción anticuerpo-antígeno. El  
30



1 resto del retentato es hidrolizado con ácido clorhídrico  
6 N en exceso en un tubo sellado y evacuado a 110°C duran-  
te 22 horas. El contenido del tubo se evapora después a se-  
5 quedad a presión reducida, se añaden 10 ml de agua al resi-  
duo y se repite la evaporación. El residuo se disuelve en  
agua hasta 10 ml y se analiza una parte alícuota utilizando  
un analizador de aminoácidos modelo 120 C de Bechman Spinco.  
Los cromatogramas resultantes indican la presencia de un  
10 cierto número de los aminoácidos normalmente presentes en  
las proteínas.

EJEMPLO 2

Una muestra de 10 g del hidrocloreuro de tetraciclina  
de partida utilizado en el Ejemplo 1 en 100 ml de agua se  
coloca en una bolsa de diálisis de acetato de celulosa y se  
15 dializa en 1,5 l de agua destilada agitada a 5°C. Una vez  
completada la diálisis, el dializado se seca por congelación  
para dar hidrocloreuro de tetraciclina exento de contaminan-  
tes proteínáceos. Esto se demuestra tratando el producto pu-  
rificado por el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, cuan-  
do el cromatograma final no indica la presencia de ningún  
20 compuesto amínico que pudiera haber sido producido por hi-  
drólisis de proteínas.

EJEMPLO 3

Una muestra de 10 g del hidrocloreuro de tetraciclina de  
partida utilizado en el Ejemplo 1 en 100 ml de agua se pasa  
25 a través de una columna de Sephadex G25 (11,5 x 125 cm) y  
la columna se eluye fraccionadamente con agua, registrando  
continuamente la densidad óptica del eluato a 254 mμ. Las  
primeras fracciones contienen contaminante proteínáceo y son  
despreciadas y las fracciones restantes se combinan y se se-  
30



1 can por congelación dando hidrocioruro de tetraciclina hipo-  
alergénico, como demuestra el ensayo ACP y la hidrólisis con  
uso subsiguiente del analizador de aminoácidos.

EJEMPLO 4

5 Unas muestras de sal cálcica de clorotetraciclina co-  
mercial, hidrocioruro de oxitetraciclina y desmetiltetraci-  
clina, todas a una concentración de 10 g en 100 ml de agua,  
fueron sometidas a los procesos de purificación descritos en  
los Ejemplos 2 y 3, haciendo lo mismo con muestras de 10 g  
10 de hidrocioruro de desmetilclorotetraciclina en 300 ml de  
agua. Los antibióticos resultantes fueron sometidos al ensa-  
yo ACP y a hidrólisis con empleo subsiguiente del analizador  
de aminoácidos, encontrándose que eran hipoalergénicos.

EJEMPLO 5

15 Un litro de un licor de fermentación filtrado y clarifi-  
cado procedente del cultivo de una variedad adecuada de  
Streptomyces aureofaciens en un medio nutritivo se pasa a  
través de una membrana sintética destinada a la separación  
de materiales de peso molecular superior a 1000 por hiperfil-  
20 tración bajo una presión de 30 psi (2,1 kg/cm<sup>2</sup>). La tetraci-  
clina contenida en el filtrado se aísla mediante preparación  
del derivado cálcico y la sal de hidrocioruro se obtiene por  
tratamiento con ácido clorhídrico. El ensayo ACP y la hidró-  
lisis seguidos del uso del analizador de aminoácidos indican  
25 que el producto es hipoalergénico.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita re-  
caerá sobre las siguientes:

28 MA



REIVINDICACIONES

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

1. Un procedimiento para la preparación de un antibiótico de tetraciclina hipoalergénico o la sal o derivado del mismo no tóxicos, cuyo procedimiento consiste en someter una forma comercial de dicho antibiótico o de dicha sal o derivado no tóxicos del mismo a un proceso de purificación basado en las diferencias de peso molecular o de dimensiones, ya sea durante la manufactura del antibiótico o después.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el proceso de purificación es una diálisis.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el proceso de purificación es una filtración en estado de gel.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el proceso de purificación implica el uso de membranas para hiperfiltración.

5. 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 UN ANTIBIOTICO DE TETRACICLINA HIPOALERGENICO".

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

Madrid, 28 mayo 1.968

BERNARDO UNGRIA

p.p.

