

354385

28 MAR



354385

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 METACILINA HIPOALERGICA".

Prioridad: Patente británica n.º 25292/67 del 1-6-67

R/G.

28 MAY

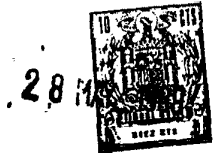


1 Este invento se refiere a un nuevo derivado de peni-
cilina de renovada utilidad, que en adelante denominaremos
derivado de penicilina hipoalergénico. Por el término "deri-
vado de penicilina hipoalergénico" se entiende un derivado
5 de penicilina que no sensibiliza a un individuo previamente
no sensible y que es menos probable que produzca una respues-
ta alérgica, por ejemplo anafiláctica, en un individuo previa-
mente sensibilizado.

10 Las penicilinas y sus sales son notables entre los
agentes quimioterapéuticos por su ausencia casi completa de
toxicidad. La reacción potencialmente adversa más grave es
su capacidad de hipersensibilización, una reacción de natu-
raleza fuertemente alérgica. La verdadera incidencia de la
hipersensibilización es difícil de estimar, pero se cree que
15 la cifra es tan alta como un 10 %. Los síntomas de hipersen-
sibilización responden al cuadro familiar de la urticaria
tal como abones o enfermedad del suero inducida por la segun-
da o subsiguientes inyecciones de una proteína inaceptable
en un animal o sujeto humano sensible. Los sujetos más sen-
sibilizados presentan el shock anafiláctico más grave que
20 incluso puede conducir a la muerte.

Un objeto del presente invento es proporcionar un de-
rivado de penicilina y sus sales en una forma que esté exen-
ta de material antígeno, que no produzca reacciones anafilác-
ticas en sujetos previamente sensibilizados y que no cause
sensibilización en las personas previamente no sensibles a
25 las penicilinas.

Por consiguiente, el presente invento proporciona
hetacilina hipoalergénica y sales no tóxicas de la misma que
comprende una forma comercial de hetacilina o de sus sales
30



1 no tóxicas de las que se ha eliminado el material antigéno
de un peso molecular de 1000 como mínimo, inherentemente pre
sente en la hetacilina o en su sal no tóxica, realizándose la
5 eliminación durante la manufactura de la hetacilina o des-
pués.

En el sentido utilizado aquí, el término "hetacilina"
cubre el derivado obtenido haciendo reaccionar la α -amino-
bencilpenicilina con acetona; también este compuesto ha re-
cibido el nombre de ácido 6-(2,2-dimetil-5-oxo-4-fenilimida
10 zolidin-1-il)penicilánico.

Debe entenderse que o bien puede purificarse la pro-
pia hetacilina o bien puede ser preparada a partir de una
 α -aminobencilpenicilina que ha sido purificada o preparada
a partir del ácido 6-aminopenicilánico purificado.

15 El material antigéno consiste fundamentalmente en po-
lipéptidos de elevado peso molecular y material proteínáceo
y este material no se separa por los procedimientos normal-
mente utilizados en el aislamiento y purificación de los an-
tibióticos.

20 La purificación de la hetacilina (o de los materiales
de partida a partir de los cuales se prepara) para dar un ma-
terial hipoalergénico se realiza por métodos basados en las
diferencias de peso molecular o de dimensiones e incluye el
uso de la filtración en estado de gel o diálisis o de mem-
25 branas para hiperfiltración, siendo las membranas de origen
sintético, natural o natural modificado, optativamente con
grupos funcionales polielectrolíticos.

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
30

28 MAY. 19



1 del azúcar, en el que las macromoléculas lineales de dextra-
no están reticuladas formando una red tridimensional de ca-
denas polisacáridas. Un material adecuado se encuentra en el
comercio con el nombre de Sephadex. Otro tamiz molecular ade-
5 cuado es un gel de poliacrilamida conocido por Biogel.

La presencia del contaminante en la hetacilina de par-
tida puede ser detectada dializando el material frente a
agua corriente para separar la hetacilina, concentrando la
solución del retentato, hidrolizándola y a continuación ana-
10 lizando los aminoácidos resultantes por cromatografía en una
columna cambiadora de ión. Mediante este procedimiento pue-
de demostrarse que, mientras el antibiótico sin purificar
después de la diálisis e hidrólisis produce un cierto número
de los aminoácidos encontrados comúnmente en las proteínas,
15 después de la purificación no se obtienen éstos, sino sola-
mente los compuestos amínicos que pueden ser producidos por
descomposición del propio antibiótico. Otro método consiste
en someter el contaminante aislado al ensayo de anafilaxis
cutánea pasiva (ensayo ACP) en animales adecuadamente sensi-
20 bilizados.

Los siguientes ejemplos ilustran el invento.

EJEMPLO 1

Una muestra de hetacilina comercial (10 g) se suspen-
de en agua (50 ml) y se disuelve mediante la adición de so-
25 lución concentrada de carbonato potásico. La solución de la
sal potásica se introduce en una bolsa de diálisis de aceta-
to de celulosa y se dializa exhaustivamente frente a agua
corriente durante 5 días. El material retenido se seca por
congelación y después se hidroliza con un exceso de ácido
30 clorhídrico (6 N) en un tubo sellado y evacuado, a 110°C

28 MAY



1 durante 22 horas. Al final de este tiempo, el hidrolizado
se evapora a sequedad a presión reducida, se añade agua
(10 ml) y se repite la evaporación a sequedad. El residuo
se transfiere cuantitativamente a un matraz graduado y se
5 diluye con agua hasta un volumen de 10 ml. Una parte alícuo-
ta de esta solución se analiza entonces en un analizador de
aminoácidos, modelo 1200 de Beckman-Spinco, para determinar
la presencia de aminoácidos. El cromatograma resultante in-
dica la presencia de cierto número de los aminoácidos que
10 se encuentran normalmente en las proteínas.

EJEMPLO 2

Unas muestras de hetacilina exentas de proteína por
filtración en estado de gel o diálisis se tratan en la for-
ma descrita en el Ejemplo 1. En este caso el cromatograma
15 final no muestra la presencia de ningún aminoácido, excepto
los que se obtienen como resultado de la hidrólisis de la
propia hetacilina o ampicilina, indicando con ello la ausen-
cia de proteína en el antibiótico purificado.

EJEMPLO 3

20 Una solución de la sal potásica de hetacilina (100 g)
en agua (300 ml) se pasa a través de una columna de Sephadex
G.25 (11,5 x 152 cm) y se eluye con agua. El eluato se ana-
liza por medida continua de su densidad óptica a 254 m μ .
La primera fracción que contiene proteína se desprecia y el
25 resto del eluato se enfría y acidula a pH 2,5 y la hetaci-
lina ácida precipitada se separa por filtración, se lava y
se seca a 40°C. El producto era hipocalérgico, como indica-
ba el ensayo ACP en cobayas sensibilizados.

EJEMPLO 4

30 Se repite el procedimiento descrito en el Ejemplo 3



1 a excepción de que la sal potásica de hetacilina se disuelve
en una mezcla de agua (150 ml) y acetona (150 ml) y se uti-
liza una mezcla similar para la elución. El Sephadex utiliza-
do es la clase LH20 y el producto se aísla en la forma des-
5 crita en el Ejemplo 3. De nuevo, los ensayos indican que el
producto es hipóalergénico.

EJEMPLO 5

Se repite el procedimiento descrito en el Ejemplo 3
con la excepción de que el producto se aísla en forma de su
10 sal potásica por secado por congelación del eluato exento de
proteína.

EJEMPLO 6

Se repite el procedimiento descrito en el Ejemplo 4
a excepción de que la sal potásica se aísla por secado por
15 congelación después de separar la mayor parte de la acetona
por evaporación a presión reducida.

EJEMPLO 7

La sal potásica de hetacilina (10 g) se disuelve en
una mezcla de agua (15 ml) y acetona (15 ml), se coloca en
una bolsa de diálisis de acetato de celulosa y se dializa
20 en una mezcla agitada de agua destilada (1,5 l) y acetona
(1,5 l) a 5°C. El dializado se lleva a pH 4,7 y la α -amino-
bencilpenicilina presente se separa por filtración; después
se lleva a pH 2,5 y la hetacilina precipitada se filtra, se
25 lava y se seca. Los ensayos con la hetacilina producida de-
muestran la ausencia de impurezas antígenas de alto peso mo-
lecular.

EJEMPLO 8

Se disuelve hetacilina (10 g) en ácido clorhídrico
30 (1 N, 200 ml) y la solución se coloca en una bolsa de diáli-



1. sis de acetato de celulosa y se dializa en ácido clorhídrico (1 N, 1 l) a 10°C. El dializado se evapora a presión reducida hasta la mitad de su volumen y el pH se ajusta a 2,5. La hetacilina precipitada se separa por filtración, se lava y se seca.

5

EJEMPLO 9

Se disuelve hetacilina (10 g) en ácido clorhídrico (1 N, 200 ml) y se pasa a través de una columna de Sephadex G.25, realizándose la elución con ácido clorhídrico (1 N). Después de descartar la fracción que contiene proteína, el eluato se concentra hasta la mitad de su volumen a presión reducida y se ajusta el pH a 2,5. La hetacilina precipitada se separa por filtración, se lava y se seca.

10

EJEMPLO 10

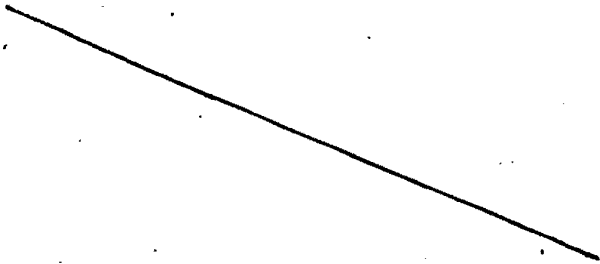
Se disuelven 10 g de hetacilina en 200 ml de ácido clorhídrico 1 N y la solución se pasa a través de una membrana destinada a la separación de materiales de peso molecular superior a 1000 por hiperfiltración, bajo una presión de 30 psi (2,1 kg/cm²). El filtrado se evapora a vacío hasta pequeño volumen, se ajusta a pH 2,5 y la hetacilina precipitada se separa por filtración, se lava y se seca. El producto es hipoalergénico como demuestra el ensayo ACP.

15

20

En resumen la Patente de Invención que se solicita recaerá sobre las siguientes:

25



30



28 MA

REIVINDICACIONES

1
5
10
1. Un procedimiento para la preparacion de hetacili
na hipoalergénica o una sal no tóxica de la misma, cuyo pro-
cedimiento consiste en someter una forma comercial de heta-
cilina o de una sal no tóxica de la misma como mínimo a un
proceso de purificación basado en las diferencias de peso
molecular o de dimensiones, ya sea durante la manufactura
de la hetacilina o después, para separar de la misma el ma-
terial antigéno de peso molecular 1000 como mínimo, inheren-
temente presente en la hetacilina.

15
2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, ca-
racterizado por una modificación que consiste en que la he-
tacilina se prepara a partir de α -aminobencilpenicilina que
ha sido sometida como mínimo a un proceso de purificación
basado en las diferencias de peso molecuar o de dimensiones.

20
3. Un procedimiento según la Reivindicación 2, ca-
racterizado por una modificación que consiste en que la α -
aminobencilpenicilina se prepara a partir de ácido 6-amino
penicilánico que ha sido sometido como mínimo a un proceso
de purificación basado en las diferencias de peso molecular
o de dimensiones.

25
4. Un procedimiento según cualquiera de las Reivin-
dicaciones 1 a 3, en el que el proceso de purificación es
una diálisis.

5. Un procedimiento según cualquiera de las Reivin-
dicaciones 1 a 3, en el que el proceso de la purificación
es una filtración en estado de gel.

30
6. Un procedimiento según cualquiera de las Reiv-
vindicaciones 1 a 3, en el que el proceso de purificación
implica el uso de membranas para hiperfiltración.

28



1

7. 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 HETACILINA HIPOA-
LERGICA".

5

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de nueve páginas me-
canografiadas.

Madrid, 28 mayo 1.968

BERNARDO UNGRIA

P.D.

10

15

20

25

30