

364195

27 FEB



SECCION TECNICA

SECRETARIA DE ECONOMIA

CLASE A-61-

CLASE K

# 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 DEGRADACION  
DE LOS MATERIALES ANTIGENOS EN EL ACI-  
DO 6-AMINOPENICILANICO"

Prioridad: Patente británica n.º 09778 del 29-2-1.968

gc.-



1           Este invento se refiere a un método para reducir  
las propiedades antigénicas asociadas con el ácido 6-aminopenicilánico y las penicilinas y sus derivados, obtenidos por procesos de fermentación.

5           El ácido 6-aminopenicilánico y las penicilinas y sus derivados obtenidos por procesos de fermentación como los definidos más adelante y aislados por métodos convencionales, contienen impurezas fuertemente antigénicas. Estas impurezas causan conocidos inconvenientes cuando las penicilinas (que pueden haber sido preparadas a partir del ácido 6-aminopenicilánico) son utilizadas como agentes terapéuticos, por ejemplo pueden producir shock anafiláctico en los pacientes. Por lo tanto, un objeto del presente invento es proporcionar un procedimiento para degradar estas impurezas antigénicas de forma que la inmunogenicidad del producto y su reactividad con anticuerpos específicos se reduzcan en gran parte.

10           Por consiguiente, el presente invento proporciona un procedimiento para la degradación de los materiales antigénicos en el ácido 6-aminopenicilánico y penicilinas y sus derivados, obtenidos por un método de fermentación como el descrito más adelante, cuyo procedimiento consiste en poner en contacto una solución acuosa que contenga dicho ácido 6-aminopenicilánico o penicilina o sus derivados con un derivado insoluble en agua, como mínimo, de un enzima proteolítico por lo menos.

15           Debe entenderse que el proceso de degradación puede ser aplicado a: (1) penicilinas producidas por fermentación directa en presencia de un precursor de cadena lateral, (2) ácido 6-aminopenicilánico preparado por fermentación directa

20  
25  
30

27 FEB.



1 en un medio nutritivo sintético, (3) ácido 6-aminopenicilá-  
nico preparado por hidrólisis enzimática de una penicilina,  
5 (4) ácido 6-aminopenicilánico o un éster del mismo, prepara-  
do por separación química de la cadena lateral de una peni-  
cilina o (5) penicilinas o sus derivados preparados a par-  
tir de ácido 6-aminopenicilánico no tratado previamente por  
el procedimiento de degradación; las penicilinas pueden ser  
preparadas por acilación directa del ácido 6-aminopenicilá-  
nico y purificadas directamente o convertidas en derivados  
10 estrechamente relacionados, por ejemplo el producto de reac-  
ción de  $\alpha$ -aminobencilpenicilina con acetona, cuyo derivado  
es sometido al procedimiento de degradación.

Los derivados de enzima insolubles en agua son pre-  
parados por métodos conocidos, por ejemplo por los métodos  
15 descritos en las memorias de patentes inglesas nº 916.931  
y 1.062.596. De preferencia, el enzima proteolítico utiliza-  
do es la pronasa, que es aislada del Streptomyces griseus  
y tiene una amplia especificidad. El enzima puede reaccionar,  
por ejemplo, con bromoacetilcelulosa o combinarse con  
20 CM-Sephadex ("Sephadex" es una marca registrada), en pre-  
sencia de un reactivo formador de amida adecuado, tal como  
carbo-di-imida. Los derivados insolubles en agua conservan  
la actividad del enzima madre, pero en uso permanecen en  
forma insoluble en agua y por lo tanto pueden ser utilizados  
25 en procedimientos continuos en columnas y otros equipos.  
Puede encontrarse presente más de un enzima en la forma in-  
soluble en agua para ampliar la gama de actividad, con el  
mayor grado de degradación consiguiente de los antígenos  
proteínicos en el material de partida.

30 Con la pronasa insoluble en agua, el procedimiento se

27 FEB



1 realiza preferiblemente a pH 7-8 para obtener los mejores resultados y la digestión de los materiales proteínicos se produce rápidamente, probablemente en 1 a 3 horas.

5 La eficacia de la pronasa para degradar las impurezas antigénicas proteínicas encontradas en el ácido 6-aminopenicilánico ha sido demostrada mediante ensayos realizados con una fracción antigénica aislada, que fue tratada con pronasa. Los ensayos consistían en la electroforesis y cromatografía de la fracción tratada y demostraban que se comportaba como una mezcla de aminoácidos. Por diálisis de la fracción tratada quedaba solamente un retentado de pronasa, mientras que la fracción inicial no era dializable en un ensayo de control. Mediante el ensayo ACP se ha establecido que no se han producido anticuerpos en los animales inyectados con la fracción tratada. La eficacia de la pronasa no es afectada cuando la fracción antigénica se mezcla con un gran exceso de ácido 6-aminopenicilánico, es decir en la situación correspondiente a la del ácido 6-aminopenicilánico comercial. Se encontraron resultados similares sobre la eficacia de los derivados de pronasa insolubles en agua en los ensayos realizados con remesas de ácido 6-aminopenicilánico y penicilinas tales como la bencilpenicilina y la  $\alpha$ -aminobencilpenicilina.

Los siguientes ejemplos ilustran el invento:

EJEMPLO 1

25 Las fracciones de impureza antigénica previamente aisladas del ácido 6-aminopenicilánico comercial utilizando un tamiz molecular fueron sometidas a los siguientes ensayos:

30 Se disuelven 1,5 mg de la fracción en ácido clorhídrico 5,7 N y se hidroliza a  $105^{\circ} + 1^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas. El

27 FEB



1 producto se examina con un analizador de aminoácidos.

Otros 1,5 mg de la fracción se disuelven en 0,5 ml de una solución reguladora 0,05 M de bicarbonato amónico a pH 7,9 y se agregan 10 gammas de una solución de 1,5 mg de pronasa por mililitro de la misma solución reguladora y la mezcla se incuba a 37°C durante 16 horas, después se evapora a sequedad y el producto se examina también con un analizador de aminoácidos.

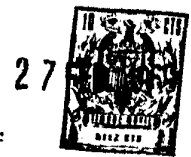
En ambos productos se determina la presencia de un gran número de aminoácidos y algunos pequeños péptidos, probablemente dipéptidos que al parecer se forman. Los experimentos demuestran que la pronasa carece de especificidad y degrada el material proteínico a aminoácidos y pequeños péptidos de la misma forma que el tratamiento con ácido.

15 EJEMPLO 2

Se mezclan 2 mg de la fracción de impureza antigénica (previamente aislada del ácido 6-aminopenicilánico comercial empleando un tamiz molecular) en 1 ml de solución reguladora 0,05 M de bicarbonato amónico a pH 8,3 con 0,02 mg de pronasa soluble en agua comercial y se incuba a 37°C durante 22 horas.

La mezcla digerida presenta una capacidad considerablemente reducida para provocar la formación de anticuerpos como indican los ensayos ACP en cobayas. En los ensayos de control se utiliza (1) la fracción de impureza antigénica sin tratar en la solución reguladora y recién preparada antes de la inyección y (2) 2 mg de la fracción de impureza antigénica tratada en la forma antes descrita pero sin adición de pronasa.

30 Los resultados están indicados en la siguiente Ta-



1 bla I.

TABLA I

Tiempo (días)	Grupo	Nº de animales positivos por nº total de animales probados	Diámetro de la mancha (mm)
5	A	0/4	0
	B	0/4	0
	C	0/10	0
10	A	2/4	10
	B	1/3	10
	C	0/9	0
15	A	3/4	25
	B	2/3	25
	C	0/9	0
20	A	3/3	30
	B	3/3	30
	C	1/8	23
25	A	3/3	26
	B	3/3	28
	C	2/7	18
30	A	3/3	27
	B	3/3	28
	C	2/7	20

A = fracción de impureza antigena sin tratar

B = fracción incubada sin pronasa

C = fracción incubada con pronasa.

En el experimento se utilizaron tres grupos de cobayas, empleándose cuatro cobayas en cada uno de los grupos A y B y diez cobayas en el grupo C.

Los animales del grupo A fueron inmunizados con 0,25 ml de la mezcla incubada a partir de la fracción de impureza antigena y pronasa, mezclada con 0,25 ml de un auxiliar completo de Freund. Los animales de los grupos B y C fueron inmunizados de forma similar con soluciones preparadas para los ensayos de control como se ha descrito anteriormente.

27 FEB



1 A los intervalos indicados se sangraron los anima-  
 les y los sueros obtenidos se congelaron hasta su utilización.  
 Los ensayos de anafilaxis cutánea pasiva (ACP) se realiza-  
 ron en cobayas albinas (pesando 250-300 g). Se inyectaron  
 5 unas cantidades de 0,1 ml de antisuero por vía intradérmica  
 y 18 horas más tarde los animales fueron tratados con 1 ml  
 de una solución recién preparada de la fracción de impureza  
 antigénica sin tratar (1 mg/ml en solución salina), mezclada  
 con 1 ml de una solución al 1 % de azul de Evans. Los diáme-  
 10 tros de las manchas fueron registrados al cabo de 10 minu-  
 tos.

EJEMPLO 3

15 El efecto de la pronasa sobre las propiedades anti-  
 génicas de una fracción de impureza antigénica (previamente  
 aislada del ácido 6-aminopenicilánico comercial empleando  
 un tamiz molecular) fue determinado en ensayos en la piel  
 y los resultados están indicados en la Tabla II.

TABLA II

Cantidad de antígeno inyectado (γ)	Diámetro medio de la mancha de reac- ción (mm) (después de 24 horas)	
	Fracción de impu- reza no tratada	Fracción de impu- reza tratada con pronasa
50	20	9
10	17	3
5	15	2
2,5	11	0
1	10	0
0,5	5	0
0,05	0	0

30 Se inmunizaron 8 cobayas con la fracción de impureza



1 no tratada en la forma descrita en el Ejemplo 2. Al cabo de  
 20 días, alcanzaron un nivel uniforme de anticuerpos en el  
 suelo determinado por ensayos ACP. Al cabo de ese tiempo, se  
 realizó una determinación en la piel de cada animal con  
 5 0,05-50 gammas de la fracción de impureza en 0,1 ml de solu-  
 ción salina o con una cantidad equivalente de una fracción  
 previamente digerida con pronasa (disuelta en bicarbonato  
 amónico 0,05 M, tratada con pronasa e incubada durante 22  
 horas a 37°C, como se describe en el Ejemplo 2). Las manchas  
 10 de reacción se midieron 24 horas después del tratamiento.

EJEMPLO 4

Se realizaron experiencias semejantes a las des-  
 critas en el Ejemplo 2 con mezclas de (A) ácido 6-aminopeni-  
 cilánico y 1 % de la fracción de impureza antigéna y (B)  
 15 ácido 6-aminopenicilánico, 1 % de la fracción de impureza  
 antigéna y pronasa (al 2 % sobre la cantidad de proteína de  
 la fracción de impureza) y los resultados están indicados  
 en la Tabla III.

TABLA III

20	Tiempo (días)	Grupo	Nº de animales positivos por nº total de animales tratados	Diámetro de la mancha (mm)
	10	A	0/4	0
		B	0/4	0
	18	A	2/4	10
		B	0/4	0
25	24	A	3/4	23
		B	0/4	0
	38	A	4/4	23
		B	1/4	20
	85	A	4/4	22
		B	1/4	18
30	130	A	4/4	26
		B	1/4	20



1 La inmunogenicidad fue determinada por ensayos ACP, en la forma descrita en el Ejemplo 2.

EJEMPLO 5

5 Se determinó el efecto de la pronasa sobre la valoración del antisuero contra una fracción de impureza antigénica obtenida a partir de ácido 6-aminopenicilánico comercial y los resultados están indicados en la Tabla IV.

TABLA IV

<u>Dilución del suero</u>	<u>Diámetro medio de la mancha (mm)</u>	
	<u>Sin tratar</u>	<u>Tratada con pronasa</u>
10 1:5	26	21
1:10	25	17
1:20	21	14
1:50	19	12
15 1:100	17	10
		punto final
1:250	12	0
1:500	10	0
1:1000	7	0
		punto final
20 1:2000	4	0
Control: suero normal de cobaya diluído 1:5	0	0

25 Una mezcla de antisueros positivos contra la fracción de impureza se diluye con solución salina como indica la Tabla. Se inyecta intradérmicamente un volumen de 0,1 ml de la solución diluída a dos grupos de 4 cobayas cada uno. Uno de los grupos se trata al cabo de 18 horas con 1 ml de solución conteniendo 0,1 mg de la fracción de impureza y 30 1 ml de azul de Evans en solución salina. El otro grupo se



1 trata con una cantidad equivalente de fracción de impureza tratada con pronasa insoluble en agua (obtenida por reacción de pronasa con bromoacetilcelulosa).

EJEMPLO 6

5 Se determinó la reducción de la inmunogenicidad después de un tratamiento con pronasa insoluble en agua (a partir de bromoacetilcelulosa y pronasa) en muestras de benzilpenicilina y ampicilina comerciales y los resultados están indicados en la Tabla V.

TABLA V

<u>Compuesto</u>	<u>Tiempo (días)</u>	<u>Grupo</u>	<u>Nº de animales positivos por nº total de conejos supervivientes inmunizados</u>	<u>Diámetro medio de la mancha (mm)</u>
Penicilina	14	A	2/5	20
		C	0/5	0
"	21	A	5/5	24
		C	1/5	25
"	28	A	4/5	26
		C	1/5	23
Ampicilina	14	A	2/2	33
		C	0/3	0
"	21	A	2/2	29
		C	0/3	0
"	28	A	2/2	30
		C	0/3	0

25 Unos grupos de 5 conejos se inmunizaron con 50 mg de la penicilina ensayada. El grupo A recibió unas muestras no tratadas de las penicilinas mientras que el grupo C recibió las penicilinas después de una incubación previa con un peso igual de pronasa insoluble (a 37°C durante 22 horas en solución reguladora a pH 8,3). Las inyecciones se administraron por vía subcutánea en auxiliar completo de Freund (1:1). En el octavo y quinceavo días se administra-

30



1 ron unas inyecciones estimulantes de 50 mg de antígeno en  
auxiliar completo de Freund. Los conejos se sangraron en  
los días 1, 7, 14, 21 y 28 y el suero se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .  
5 Los ensayos ACP se llevaron a cabo sobre los antisueros em-  
pleando como antígeno peniciloil-BGG.

EJEMPLO 7

Se agregan 300 mg de pronasa en solución reguladora  
de fosfato-citrato a pH 5,1 sobre 10 g de bromoacetilcelu-  
losa (peso mojado). La suspensión se agita suavemente duran-  
10 te 30 horas a la temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C}$ ) y se añade una  
gota de agente antiespumante. A continuación se centrifuga  
la suspensión a 10.000 G durante 10 minutos y el precipi-  
tado se vuelve a suspender en 30 ml de solución reguladora  
0,1 M de bicarbonato a pH 8,9. La suspensión se deja a  $4^{\circ}\text{C}$   
15 durante 24 horas y después se centrifuga a 10.000 G duran-  
te 10 minutos. El líquido que sobrenada se conserva para  
la medida de la densidad óptica. El precipitado se vuelve  
a suspender en 2-aminoetanol 0,05 M en solución reguladora  
0,1 M de bicarbonato a pH 8,9. Finalmente la preparación  
20 se centrifuga de nuevo y se lava en cloruro sódico 0,15 M  
hasta que el líquido que sobrenada no presenta densidad  
óptica a 280 m $\mu$ .

La actividad catalítica de la pronasa combinada se  
determina empleando tirosiltirosina, triptofiltirosina o  
25 leucilglicina como sustrato. La actividad frente a estos  
sustratos es determinada cromatográficamente en función  
del tiempo, empleando pronasa soluble como control.

EJEMPLO 8

30 Se disuelven 1,5 mg de una fracción de impureza pro-  
cedente de una muestra de ácido 6-aminopenicilánico comer-



1 cial en 0,5 ml de solución reguladora 0,05 M de bicarbona-  
to amónico a pH 7,9 y se agregan 10 gammas (0,01 ml) de una  
solución que contiene 1,5 mg/ml de pronasa (como material  
insoluble en agua) en la misma solución reguladora. La mez-  
5 cla se incuba a 37°C durante 16 horas con suave agitación y  
después se evapora a sequedad.

En este ensayo se encuentra que la pronasa insoluble  
en agua puede ser utilizada repetidamente sin pérdida apa-  
rente de actividad. Por ejemplo, el material obtenido a par-  
10 tir de bromoacetilcelulosa se utiliza cinco veces durante  
10 meses. Después de cada uso, el material se lava en solu-  
ción reguladora y después en solución salina y se conserva  
a 4°C en presencia de iones calcio para estabilizar el en-  
zima.

15 En estos ensayos, los materiales insolubles en agua  
obtenidos a partir de pronasa y carboximetilcelulosa o car-  
boximetil-Sephadex son menos eficaces que el material obte-  
nido a partir de bromoacetilcelulosa.

#### EJEMPLO 9

20 Una muestra de 2g de ácido 6-aminopenicilánico comercial se  
disuelve en agua con adición de hidróxido sódico 3 N hasta  
pH 8,6 y después se diluye hasta 20 ml. La solución se divi-  
de en dos partes iguales, incubándose ambas a 37°C durante  
20 horas, con la diferencia de que una de las partes contie-  
25 ne 500 mg del compuesto de pronasa insoluble en agua (obte-  
nido a partir de pronasa y bromoacetilcelulosa). La solu-  
ción que contiene la pronasa se centrifuga y se ajusta el  
pH de ambas soluciones a 4,3 con ácido clorhídrico 3 N y  
se conserva a 0°C durante 24 horas. De ambas soluciones se  
30 recupera ácido 6-aminopenicilánico sólido, que se utiliza



1 para inmunizar a conejos de acuerdo con el siguiente programa, midiéndose la respuesta a los anticuerpos:

5 Día 1 - 50 mg del ácido 6-aminopenicilánico en auxiliar completo de Freund (2 mg/ml de butircum li) + 6 mg del ácido 6-aminopenicilánico en solución acuosa (a 6 x 0,1 ml de una solución de 10 mg/ml), todo ello subcutáneamente.

Día 7 - 40 mg de ácido 6-aminopenicilánico, por vía subcutánea, en auxiliar completo de Freund.

10 Los resultados están indicados en la Tabla VI.

TABLA VI

Indice de hemoaglutinación. Recíproco contra erythrocytes de conejo bencilpeniciloilado Día

Material	Conejo	Indice de hemoaglutinación. Recíproco contra erythrocytes de conejo bencilpeniciloilado Día				
		0	7	14	21	28
15 Acido 6-amino penicilánico de control	1	0	2048	16400	512	128
	2	0	256	512	200	256
	3	0	64	1024	100	128
20 Acido 6-amino penicilánico tratado con pronasa	4	0	6	128	32	64
	5	0	4	4	8	8
	6	0	0	0	4	128

Los resultados demuestran que se produce una notable reducción en la inmunogenicidad del ácido 6-aminopenicilánico comercial (que era una remesa con una gran inmunogenicidad) después del tratamiento con pronasa insoluble.

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

- \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_
- \_\_\_\_\_



1

REIVINDICACIONES

5

1. Un procedimiento para la degradación de los materiales antígenos en el ácido 6-aminopenicilánico y en las penicilinas y sus derivados obtenidos por un método de fermentación como el descrito anteriormente, cuyo procedimiento consiste en poner en contacto una solución acuosa que contiene el ácido 6-aminopenicilánico o la penicilina o sus derivados antes citados con un derivado insoluble en agua, como mínimo, de un enzima proteolítico por lo menos.

10

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el enzima proteolítico es pronasa.

15

3. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1 ó 2, en el que el derivado insoluble en agua se obtiene a partir del enzima y bromoacetilcelulosa.

4. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1 ó 2, en el que el derivado insoluble en agua se obtiene a partir del enzima y carboximetil-Sephadex o carboximetilcelulosa.

20

5. Un procedimiento según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en el que la degradación se realiza a pH 7-8.

25

6. Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA DEGRADACION DE LOS MATERIALES ANTIGENOS EN EL ACIDO 6-AMINOPENICILANICO".

30





1

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la --  
presate memoria, que consta de quince páginas mecanografía-  
das.

5

Madrid, 27 de febrero de 1.969

BERNARDO UNGRIA

P.P.

A handwritten signature in dark ink is written below the typed name 'BERNARDO UNGRIA'. The signature is stylized and cursive, appearing to be 'B. Ungria'.

10

15

20

25

30