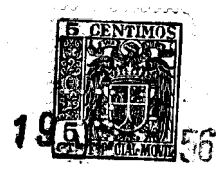


228957

P.- 14.716.-

Case Núm. F 716.

19 JUN 1956



228957

MEMORIA DESCRIPTIVA
para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de TAKEDA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LTD, entidad japonesa, establecida en 27, 2-chome, Doshomachi, Higashi-ku, Osaka, Japón, por:

"UN METODO PARA PURIFICAR SARCOMICINA"

Esta invención se refiere a un método para la preparación de sarcomicina purificada y de sus derivados.

Por sarcomicina purificada se entiende una sustancia oleosa o sólida que contiene uno o más factores activos de sarcomicina y por sus derivados se entienden compuestos aislados relacionados con los factores activos.

Según un informe de Hamao Umezawa la sarcomicina es un metabolito de una cepa perteneciente a Streptomyces erythrochromogenes y posee fuerte actividad "anti-cáncer" y



una cierta actividad antibiótica (J. Antibiotics 6, (A), 101; 147-152; 153-157 (1953); Antibiotics and Chemotherapy 4, 514 -520 (1954)).

5 Como es sabido, la sarcomicina que se encuentra actualmente en el mercado como droga contra el cáncer no es una sustancia pura sino una mezcla que contiene diversos factores que poseen actividad "anti-cáncer" o antibiótica o ambas. Como no se ha hecho ninguna comunicación sobre el aislamiento y la purificación de estos factores, éstos son todavía totalmente desconocidos.

10 Los presentes inventores han realizado una serie de estudios sobre el aislamiento y las propiedades de los factores y han conseguido preparar a partir de sarcomicina comercial sarcomicina purificada que consiste en factores activos casi puros y en algunos de sus derivados estables. Se ha visto que la sarcomicina purificada así obtenida es varias veces más fuerte que la sarcomicina comercial en actividades "anti-cáncer" y antibiótica y que los derivados poseen también actividades "anti-cáncer" y (o) antibiótica.

15 El término "anti-cáncer" empleado en esta Memoria significa inhibición de la reproducción de las células cancerosas. La administración de estas sustancias ocasiona la prolongación del lapso vital y la reducción de los dolores en los enfermos de cáncer.

20 Los derivados estables de la sarcomicina se dividen en grupo de sarcomicina-S y grupo de sarcomicina-E, se-



gún que sean antibióticos contra staphilococcus o no.

El grupo sarcomicina-S se considera producido a partir de sarcomicina por la adición de sulfuro de hidrógeno y subsiguiente oxidación.

5 Los presentes inventores han logrado aislar sarcomicina purificada y sus derivados transformando la sarcomicina en sus sales de metales pesados y utilizando las propiedades específicas de las sales.

10 En presencia de varios iones de metales pesados la sarcomicina forma fácilmente las correspondientes sales metálicas o las sales complejas. Algunas de estas sales, sin embargo, pierden la actividad original y otras son imposibles de aislar. Solo la sal de cobre carece de tal inconveniente y posee propiedades satisfactorias para la división de la sarcomicina en sus diversos factores.

15 Los materiales de partida en la presente invención son la sarcomicina preparada por el método de Umezawa, sus sales de metales alcalinos, sus sales de metales alcalino-térreos y sus productos transformados y todos ellos se pueden elaborar de la misma manera. Como sales de metales alcalinos figuran, por ejemplo: la sal sódica, la sal potásica, etc. y como sales de metales alcalino-térreos, la sal cálcica, la sal bárica, etc. Por productos transformados se entiende sarcomicina, etc. purificada utilizando la diferencia en sus coeficientes de reparto entre dos disolventes o por otros medios adecuados.

25

La sal de cobre de sarcomicina se produce sumi-

228957



nistrando ión de cobre a una solución de sarcomicina. Las sales de cobre solubles tales como sulfato cúprico y acetato cúprico se usan como fuente de ión de cobre. La sal de cobre se prepara convenientemente en agua o en un disolvente acuoso. La sal de cobre se puede dividir en sal de cobre del grupo sarcomicina-E y sal de cobre del grupo sarcomicina-S utilizando la diferencia en sus coeficientes de reparto entre el agua o un disolvente acuoso y otro disolvente inmiscible libremente con el primero. Como disolvente acuoso se emplea una solución acuosa de una sal inorgánica o una solución amortiguadora. Como disolvente inmiscible libremente con el agua o con un disolvente acuoso se usa convenientemente un ester de ácido graso inferior o un alcohol alifático inferior tal como butanol, alcohol iso-amílico, etc. También se puede usar etanol, metanol, etc. si contienen una sal en una concentración tal que ya no se mezclen con el agua en proporción libre.

Como el coeficiente de reparto entre dos disolventes de cada factor de sarcomicina es muy parecido, la sarcomicina como tal no puede dividirse en sus factores haciendo uso de la diferencia en sus coeficientes de reparto entre dos disolventes. Pero la diferencia en el coeficiente de reparto entre dos disolventes de las sales de cobre de los factores es lo suficientemente amplia para este fin. Es decir, la sal de cobre del grupo sarcomicina-E se distribuye en un disolvente orgánico y la sal de cobre del grupo sarcomicina-S en un disolvente acuoso simplemente agitando

228957

19 JUN



5 el material con los dos disolventes. Por supuesto, se puede usar para este mismo fin la cromatografía de reparto, la distribución en contracorriente u otros métodos, pero, por lo general, requieren procedimientos complicados. La sal de cobre de la fracción sarcomicina-S así separada en forma de solución acuosa se libera después de cobre, esto es, cuando se introduce sulfuro de hidrógeno en la solución el cobre se deposita y, al mismo tiempo, se produce sarcomicina-S por adición de sulfuro de hidrógeno.

10

El grupo sarcomicina-S producido de este modo se pasa a un disolvente orgánico para quitarle las impurezas solubles en el agua. El grupo sarcomicina-A se puede aún dividir en sarcomicina-S₁ y S₂ utilizando su dificultad relativa para separarse de un disolvente. Por ejemplo, cuando se concentra una solución del grupo sarcomicina-S en un ester de ácido graso inferior, se separa primero sarcomicina-S₁ y de las aguas madres se obtiene sarcomicina-S₂ bruta, que se purifica por recristalización. De las aguas madres de la recristalización se obtiene una mezcla que consiste en sarcomicina-S₁ y sarcomicina-S₂ en una relación de 2 : 1.

15

20

La sarcomicina purificada consiste casi únicamente en sus factores activos puros y se obtiene generalmente en estado oleoso o en estado sólido de la manera siguiente:

25

Una solución acuosa de las sales de cobre de

228957

19 JUN



la sarcomicina se libera de sarcomicina-E con un disolvente orgánico como se ha dicho antes y luego se trata con un cambiador de cationes para separar el ión de cobre. La solución resultante de sarcomicina purificada se acidifica y se extrae con un disolvente orgánico. El extracto que contiene factores activos se trata con un adsorbente adecuado para separar las impurezas y se evapora a baja temperatura en el vacío en la atmósfera de un gas inerte tal como nitrógeno para obtener la sarcomicina purificada.

La sarcomicina S_1 , la S_2 y la sarcomicina purificada separadas así tienen cada una la solubilidad que más adelante se indica y la facultad de formar sales. Estas propiedades se pueden utilizar para su separación y purificación.

La sarcomicina S_1 es muy poco soluble en cloroformo, tetracloruro de carbono, éter de petróleo, benceno, hexano, ciclohexano, éter y análogos; fácilmente soluble en acetona y soluble en acetato de xetilo, acetato de butilo, butanol, etc., en frío, pero más soluble en caliente. Es regularmente soluble en metanol, etanol y agua caliente, en tanto que es escasamente soluble en agua fría. La sarcomicina S_2 tiene una solubilidad un poco diferente. La solubilidad citada se resume en la Table I.



Tabla 1

Solubilidad de la sarcomicina purificada, la sarcomicina S₁ y la sarcomicina S₂

Disolventes	Sarcomicina S ₁		Sarcomicina S ₂		Sarcomicina purificada.
	Frio	Caliente	Frio	Caliente	Frio
Agua	±	++	+	++	+
Metanol	++	++	++	+++	+
Etanol	++	++	++	+++	+
Butanol	+	++	+	++	+
Alcohol isoamfílico.....	±	+	+	++	+
Benceno	-	-	-	-	±
Hexano	-	-	-	-	-
Ciclohexano	-	-	-	-	-
Eter	-	-	-	-	-
Acetona	+++	+++	+++	+++	±
Acetato de etilo	+	++	++	++	+
Acetato de butilo	+	++	++	++	+
Cloroformo	-	-	-	-	±
Tetracloruro de carbono	-	-	-	-	-
Eter de petróleo	-	-	-	-	-

Observaciones: -: insoluble, ± : escasamente soluble,
 += soluble, ++ : bastante soluble,
 +++ : muy soluble.

228957

19 JB



5 Tanto la sarcomicina S_1 como la sarcomicina S_2
son sustancias ácidas y forman sales o sales complejas con
varios metales. Estas sales son generalmente poco solubles
en disolventes orgánicos, pero existen algunas sales com-
plejas que son solubles en los disolventes orgánicos. To-
das las sales **excepto** la sal de cobre han **perdido ya** la
actividad original y en la mayoría de los casos sus solu-
bilidades no son apropiadas para la separación de la sar-
comicina S_1 de la sarcomicina S_2 . Las sales de los meta-
10 les alcalinos y alcalino-térreos del grupo sarcomicina S
conservan su actividad original y por ello se pueden usar
para el mismo fin que la sarcomicina purificada.

15 En general, la solubilidad de los derivados de
sarcomicina aumenta o disminuye en proporción inversa al
aumento o la disminución de su pureza. Las propiedades fi-
sicas de cada factor se exponen en la Tabla 2.

228957

19



Tabla 2.

Propiedades de la sarcomicina purificada. la sarcomicina S₁ y la
sarcomicina S₂

	Sarcomicina S ₁	Sarcomicina S ₂	Sarcomicina purificada.
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₈ O ₆ S ₂	C ₁₄ H ₁₈ O ₆ S	-
Forma cristalina	Placas incoloras	Agujas incoloras	Aceite
Punto de fusión	160° C.	181° C.	-
Disolvente para la recristalización	Acetato de etilo	Acetato de etilo	-
Rotación específica. $[\alpha]_D^{24}$	+ 145° (metanol)	+136° (metanol)	-
Absorción máxima del espectro ultravioleta	300 μ	295 μ	-
Espectro de absorción de infrarrojo. (Se expone en la	Fig. 1	Fig. 2	-
Ensayo Anthrone	+	+	+

Observación: Los espectros de absorción de infrarrojo se observaron con lodo en aceite de parafina Nujol



5 Como se ha mencionado antes, la separación entre las impurezas y cada factor y entre los factores se realiza utilizando la diferencia en sus **coeficientes** de reparto entre dos disolventes, su facultad para formar sales, especialmente sal de cobre, o la solubilidad de las sales. La separación se efectúa también utilizando sus dializabilidad y la diferencia en su adsorbabilidad. Por tener un peso molecular relativamente pequeño, cada uno de los factores de sarcomicina es dializable y, por 10 ello, puede separarse fácilmente de las impurezas no dializables por diálisis. Cada uno de los factores puede también separarse de las impurezas dializables transformando el factor en una forma no dializable.

15 Cuando la separación entre los factores se efectúa utilizando la diferencia en su adsorbabilidad, se emplea como adsorbente carbón activo, alúmina o gel de sílice, por ejemplo. El factor adsorbido se eluye con un disolvente orgánico tal como alcoholes **alifáticos** inferiores y ésteres de ácidos grasos inferiores. La adsorción se 20 realiza añadiendo el adsorbente a una solución del material o irrigando una capa del adsorbente con la solución.

25 Cada uno de los factores de **sarcomicina** se puede separar de su solución cambiando la concentración, la temperatura, el pH o la constitución de la solución. Estos medios se utilizan para la purificación intermedia o final de los factores. La evaporación de la solución, así como también la recristalización, pertenecen, desde luego, al

228957



método de purificación de los factores. La sarcomicina es generalmente estable en un medio ácido. Por ello, su purificación se realiza convenientemente en un pH ácido. Los factores activos de la sarcomicina son electronegativos y, por ello, muestran afinidad por la electricidad positiva. De aquí que se puedan separar ventajosamente de las impurezas por el uso de una resina de cambio iónico tal como Amberlite IR-120.

Los métodos de purificación acabados de mencionar basados en la diferencia de propiedades entre los factores activos o entre los factores activos y las impurezas se emplean bien solos o bien combinados o repetidamente, si es preciso, para la purificación de los factores y de sus derivados. Un ejemplo de los métodos se ilustra en la Tabla 3.

Las actividades antibióticas y "anti-cancer" de los factores activos se resumen en la Tabla 4.

Según resulta evidente de la Tabla, la sarcomicina purificada, la sarcomicina S_1 y la sarcomicina S_2 presentan actividad "anti-cáncer" y se pueden emplear para fines clínicos como tales o bien en forma de sales de metales alcalinos o alcalino-térreos.

El grupo sarcomicina E distribuido en el disolvente orgánico en forma de sal de cobre se puede dividir todavía más en sarcomicina E_1 , sarcomicina E_2 , etc. Estas se cree que son polímeros de los factores activos de la sarcomicina. El grupo sarcomicina E es generalmente más débil que el grupo sarcomicina S en actividad biológica.



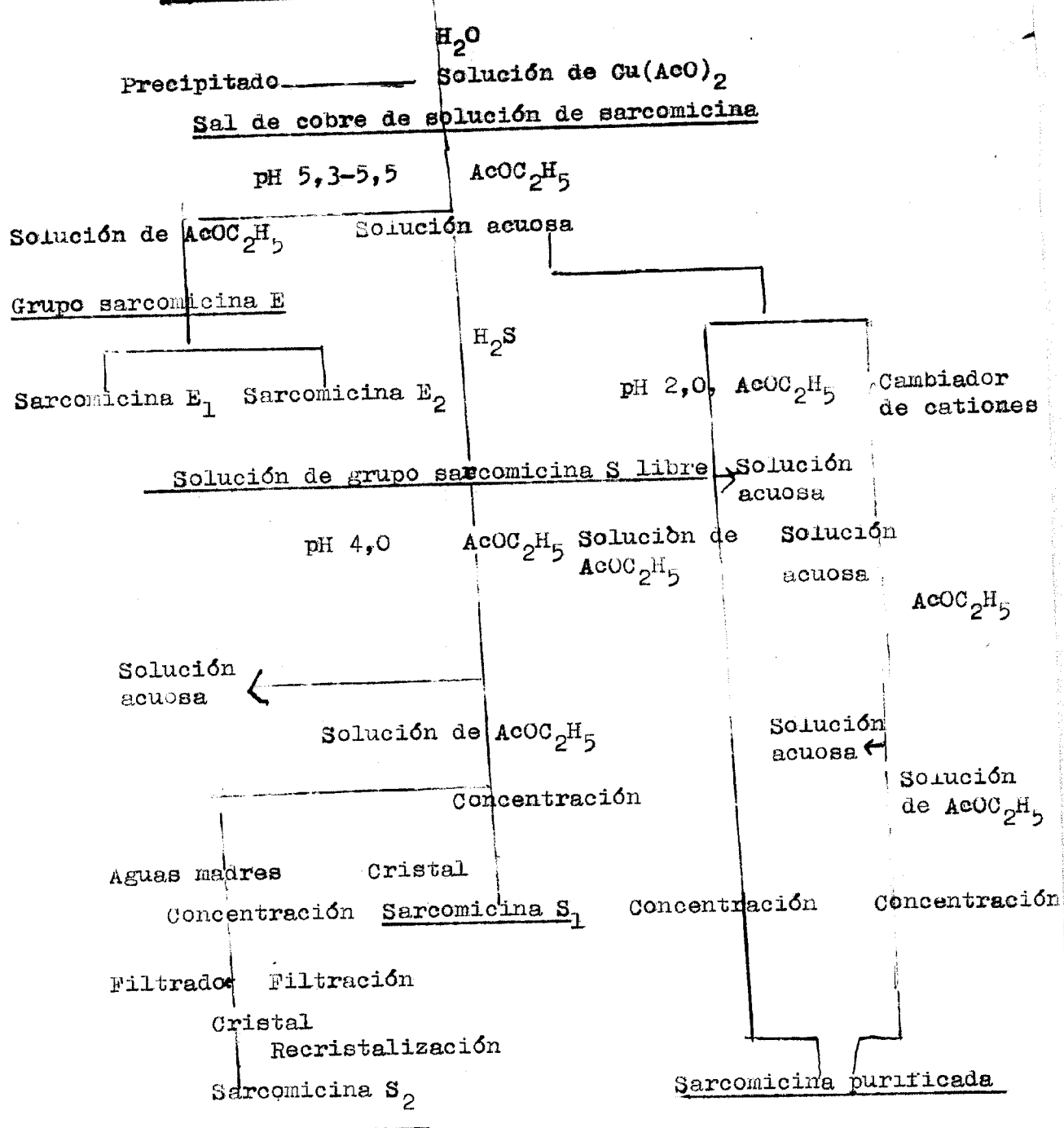
A continuación se dan simples ejemplos de los procesos de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención no está limitada por éstos ejemplos.



Tabla 3.

Un ejemplo de esquema

Sal sódica de sarcomicina cruda



Observaciones: AcO = CH₃COO,



Tabla 4

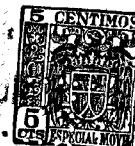
Actividad de la sarcomicina purificada, la sarcomicina S₁ y la

sarcomicina S₂

	Sarcomicina S ₁	Sarcomicina S ₂	Sarcomicina purificada
Dosis mínima necesaria para inhibir la propagación del carcinoma Ehrlich inoculado a ratones en 12 días (inyección)	5-10 mg.	5-10 mg.	1 mg.
Actividad antibiótica contra <u>Micrococcus flavus</u>	10,52 mg. ^a /mg	0,6 mg.* mg	4-5 mg. ^a /mg
Actividad antibiótica contra <u>Staphylococcus aureus</u>			4-5 mg./ mg.

Observaciós: *: Concentración **mínima** de Sarcomicina tipo necesaria para la inhibición **completa**.

228957



Ejemplo 1.

Se disuelven 50 gramos de la sal sódica de sarcomi-
cina en 100 cc. de agua bajo refrigeración por hielo y a la
solución se añade una solución acuosa saturada de acetato
5 cúprico con agitación hasta que ya no se forme más precipita-
do. El precipitado se filtra y se lava bien con agua. El fil-
trado se junta con el lavado, se ajusta a pH 5,4 con ácido
clorhídrico (o con bicarbonato sódico) y se extrae con ace-
tato de etilo. La extracción con acetato de etilo se repite
10 hasta que la capa de acetato de etilo sea incolora. De este
modo, el grupo sarcomicina E, que es inactivo contra staphylo-
coccus pero activo contra el carcinoma Ehrlich, se distribu-
ye en la capa de acetato de etilo. En la capa acuosa se intro-
duce sulfuro de hidrógeno, el sulfuro cúprico que precipita
15 se separa por filtración y el filtrado se extrae con el mismo
volumen de acetato de etilo. El extracto se concentra y se
deja reposar, después de lo cual se separan cristales brutos
de sarcomicina S₁, que se recrystalizan de acetato de etilo en
escamas incoloras de p. de f. 160°C. El rendimiento es de
20 2,2 g. La sarcomicina S₁ así obtenida es una sustancia ácida
y no da ningún espectro ultravioleta de absorción especial.
Análisis. Calculado para C₈H₁₀O₄ S: C, 47,51, H, 4,90, S, 15,86
Encontrado: C, 48,88, H, 5,07, S, 15,55
C, 48,13, H, 5,23, S, 15,23
25 La actividad antibiótica del producto contra staphylo-
coccus es 10,52 mg * /mg. Cuando una solución acuosa que con-
tiene 5-10 mg. de la sal sódica del producto se inyecta en un



ratón inoculado con carcinoma Ehrlich durante 12 días, se observa la inhibición de la reproducción del carcinoma Ehrlich.

Las aguas madres de la sarcomicina S_1 se dejan reposar para precipitar escamas incoloras. Los cristales se purifican por recristalización de acetato de etilo (p. de f., 148-149°C.) y luego se someten a recristalización fraccionada para obtener escamas incoloras (sarcomicina S_1) que funden a 160°C. y agujas incoloras (sarcomicina S_2) que funden a 181°C., $[\alpha]_D^{24} = +136^\circ$ (C = 0,5, etanol).

La actividad antibiótica de la sarcomicina S_2 contra staphylococcus es $< 0,6$ mg. \times /mg.

Ejemplo 2.

Se disuelven 50 gramos de la sal sódica de sarcomicina (o sarcomicina libre) en 500 cc. de agua bajo refrigeración. Luego de ajustada la solución a pH 2,0 con ácido clorhídrico al 10 %, se añade gradualmente sulfato amónico cristalino a la solución, con lo cual se separa una sustancia oleosa. Cuando la solución se ha saturado completamente de sulfato amónico, se separa la sustancia oleosa y la solución acuosa se somete a extracción con la misma cantidad de acetato de etilo. La solución de acetato de etilo se concentra a presión reducida en corriente de nitrógeno para obtener 10 g. de una sustancia oleosa ligeramente amarillenta. Esta sustancia presenta actividad antibiótica cuatro veces mayor que la del material de partida. Cuando este producto se inyecta durante 12 días a un ratón inoculado con carcinoma Ehrlich se observa la inhibición de la reproducción del carcinoma Ehrlich.



5 La sustancia oleosa se disuelve luego en 250 cc. de agua y la solución se satura con sulfato amónico de la misma manera que antes. Después de apartar la sustancia oleosa separada, la solución acuosa se trata de la misma manera que antes para obtener 3 g. de una sustancia oleosa amarillenta clara. El proceso se repite para obtener sarcomicina purificada.

Ejemplo 3.

10 Se disuelven 50 gramos de sal sódica de sarcomicina (o sarcomicina libre) en 100 cc. de agua bajo refrigeración. (En el caso de la sarcomicina libre, el pH de la solución se ajusta a 6,0 con carbonato sódico).
A la solución se añade una solución acuosa saturada de
15 acetato cúprico con agitación hasta que no se forma ya más precipitado. El precipitado se filtra, se lava con agua. El filtrado se junta con el lavado, se ajusta a pH 5,4 exactamente con ácido clorhídrico (o bicarbonato sódico) y se extrae con acetato de etilo. Se repite el mismo proceso hasta que la capa de acetato de etilo no es ya coloreada. La capa acuosa así obtenida se
20 pasa (10 cc. por minuto) a través de un tubo de vidrio (10 cm. de diámetro, 500 cc. de capacidad) relleno de Amberlite IR- 120 (forma H). El eluato de color pardo claro se agita con una tercera parte de acetato de etilo sin alterar el pH y la capa de acetato de etilo se
25 separa. La extracción con acetato de etilo se repite hasta que la capa de acetato de etilo no sea ya coloreada y



228957

la solución de acetato de etilo obtenida de este modo se concentra a presión reducida en corriente de nitrógeno para obtener 12 g. de sarcomicina purificada en forma de una sustancia resinosa de color pardo. El ensayo Anthrone es positivo para este producto, cuando el producto se inyecta a un ratón inoculado con carcinoma Ehrlich durante 12 días, se observa la inhibición de la reproducción del carcinoma Ehrlich. La adición de un antioxidante tal como glucosa a la solución liberada de iones positivos con Amberlite IR-120 aumenta el rendimiento de sarcomicina purificada.

Ejemplo 4.

Se disuelven 50 gramos de sal sódica de sarcomicina (o sarcomicina libre) en 100 cc, de agua bajo refrigeración con hielo. Cuando se emplea sarcomicina libre como material, el pH de la solución acuosa se ajusta a 6,0 con bicarbonato sódico. A la solución se añade una solución acuosa saturada de acetato cúprico con agitación hasta que ya no se forma más precipitado. El precipitado se filtra y se lava con agua y el lavado se junta con el filtrado. Las soluciones juntadas se ajustan a pH 5,4 exactamente y se agitan con acetato de etilo. La extracción con acetato de etilo se repite hasta que la capa de acetato de etilo no es ya coloreada. La capa acuosa así obtenida se ajusta a pH 2,0 con ácido clorhídrico y se agita con una tercera parte de acetato de etilo. La extracción con acetato de etilo se repite hasta que la capa de acetato de etilo ya no es

228957

19 JUN



5 coloreada. La capa de acetato de etilo obtenida así se concentra a presión reducida en corriente de nitrógeno a baja temperatura para obtener 14 g. de sarcomicina purificada en forma de una sustancia resinosa de color pardo. El ensayo Anthrone para este producto es positivo. Cuando el producto se inyecta a un ratón inoculado con carcinoma Ehrlich durante 12 días, se observa la inhibición de la reproducción del carcinoma Ehrlich.

Ejemplo 5.

10 La capa acuosa liberada de la solución en acetato de etilo de grupo sarcomicina E del Ejemplo 1 se ajusta a pH 2,0 con ácido clorhídrico y se agita con una tercera parte de acetato de etilo. La extracción con acetato de etilo se repite hasta que la capa de acetato de etilo ya
15 no esté coloreada. El extracto de acetato de etilo se concentra a presión reducida a baja temperatura en corriente de nitrógeno para dar 14 g. de sarcomicina purificada en forma de una sustancia resinosa de color pardo. El ensayo Anthrone de este producto es positivo. Cuando el producto
20 se inyecta a un ratón inoculado con carcinoma Ehrlich durante 12 días, se observa la inhibición de la reproducción del carcinoma Ehrlich.

25 Esta solicitud que corresponde a la presentada en el Japón, el 4 de Junio de 1.955, bajo el Núm. 15.320, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto Ley sobre Propiedad Industrial.

228957



----- N O T A -----

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, son los siguientes:

5 1º.- "Un método para purificar sarcomicina," que consiste en separar sarcomicina purificada por intermedio de una sal de cobre de sarcomicina.

10 2º.-Un método para purificar sarcomicina, que consiste en recoger sarcomicina en forma de su sal de cobre y tratar luego con un cambiador de iones ésta sal.

 3º.- Un método para purificar sarcomicina, que consiste en recoger sarcomicina en forma de su sal de cobre y agitar luego una solución en un disolvente orgánico de la sal de cobre con un disolvente ácido acuoso.

15 4º.-Un método para purificar sarcomicina, que consiste en recoger sarcomicina en forma de su sal de cobre, separar el cobre de la sal de cobre y agitar la sarcomicina liberada con un disolvente orgánico y un disolvente acuoso para pasar la sarcomicina purificada al disolvente orgánico.

20 5º.- Un método para purificar sarcomicina, que consiste en eliminar el cobre de la sal de cobre de sarco-

228957



micina utilizando un cambiador de iones.

5 6º.- Un método para purificar sarcomicina, que consiste en tratar una solución que contenga sarcomicina S_1 y/o sarcomicina S_2 con un adsorbente para adsorber el componente y eluir luego el componente

7º.- Un método para aislar grupo sarcomicina S y grupo sarcomicina E, que consiste en utilizar la diferencia entre sus sales de cobre en el coeficiente de reparto entre dos disolventes.

10 8º.- Un método para preparar sarcomicina S_1 , que consiste en eliminar el cobre de su sal de cobre utilizando sulfuro de hidrógeno.

15 9º.- Un método para preparar sarcomicina S_2 , que consiste en eliminar el cobre de la sal de cobre de sarcomicina utilizando sulfuro de hidrógeno y separar sarcomicina S_1 y concentrar las aguas madres libres de sarcomicina S_1 .

10º.- Un método para purificar sarcomicina.

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

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

Madrid, 19 JUN 1958

Alberto de Eizaburu
Por Poder.

228957

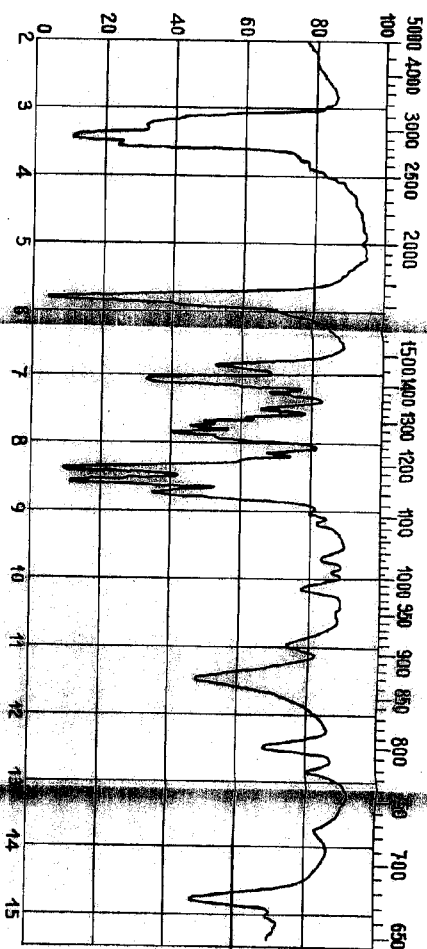


Fig. 1

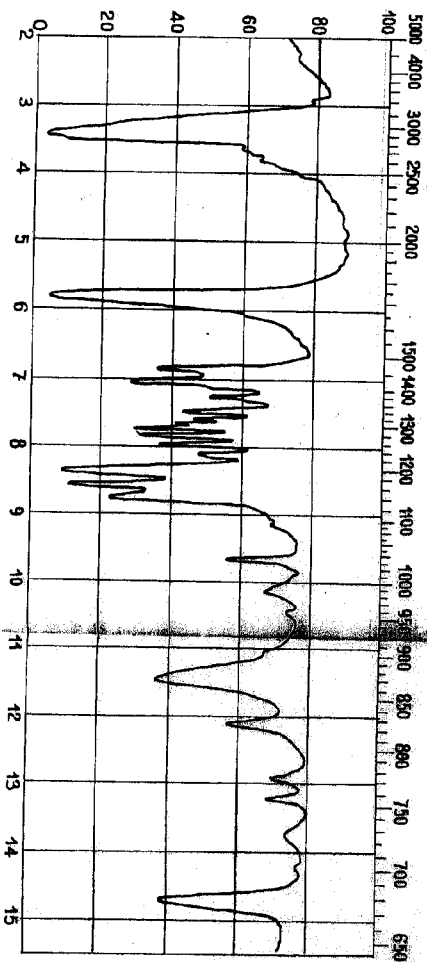


Fig. 2

Wm. S. Phillips
1907