



⑩ ES	⑪ NUMERO	⑩ A1
	462.245	
	⑫ FECHA DE PRESENTACION	
	9-9-77	

**PATENTE DE INVENCION**

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

⑤① PRIORIDADES:		
⑤② NUMERO	⑤③ FECHA	⑤④ PAIS
109648/1.976	13-9-76	Japón
⑤⑤ FECHA DE PUBLICIDAD	⑤⑥ CLASIFICACION INTERNACIONAL	⑤⑦ PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C012D; A61K	
⑤⑧ TITULO DE LA INVENCION		
"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN AGENTE ANTIMALIGNO DERIVADO DEL STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS 'STF'".		
⑤⑨ SOLICITANTE (ES)		
TOBISHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
No. 9-9, 1-chome, Yaesu, Chuoh-Ku, Tokyo, Japón.		
⑤⑩ INVENTOR (ES)		
Shigeshi Toyoshima, Mie Itoh, Syosuke Yamamura, Yoshiko Seto, Haruhisa Fujita, Mariko Fukuma, Mikiro Fujiwara y Munemoto Itoh.		
⑤⑪ TITULAR (ES)		
⑤⑫ REPRESENTANTE		
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ		(P.- 66.917)

FUNDAMENTO DEL INVENTO

## 1. Campo del invento:

El presente invento se refiere a un nuevo agente antimaligno. Más particularmente, el presente invento se refiere a un procedimiento para preparar una nueva sustancia activa obtenida cultivando *Staphylococcus epidermidis* STF (Bikoken Deposit. nº 3706; ATCC 31310) en un medio líquido.

La sustancia anterior presenta un efecto de inhibir la leucemia y los tumores malignos.

El presente invento está basado en el descubrimiento de que en un paciente con leucemia, se redujeron las células leucémicas en un número notablemente inesperado cuando el paciente desarrolló un furúnculo, y finalmente, el número de leucocitos del paciente se hizo normal.

Los inventores separaron una cepa de microorganismos del furúnculo de este paciente, la cultivaron, administraron un filtrado de la solución de cultivo a animales afectados de leucemia inducida y confirmaron que la administración del filtrado dió lugar a tales efectos en los animales afectados como la reducción en la cantidad de virus de leucemia, reducción en el número de células leucémicas, recuperación de los órganos afectados por leucemia, prolongación de la vida y aumento en el número de animales supervivientes. A continuación de las investigaciones, los inventores han encontrado además, que dicho filtrado es eficaz no solamente para la leucemia sino también generalmente para otros tumores malignos.

Los inventores concentraron el filtrado de la solución de cultivo, fraccionaron las sustancias solubles en agua consideradas como ingredientes activos en un número de fracciones y aislaron y purificaron las sustancias para probar que las sustancias tenían la actividad antimaligna antes descrita.

DESCRIPCION DEL INVENTO:

(1) Identificación de la cepa:

La cepa del microorganismo empleado en el presente invento es una cepa nueva. Se depositó en "Bikoken" y ATCC como Depósito de Bikoken Nº 3706 y ATCC 31310, respectivamente. La cepa está libremente disponible para todas las personas en estas instituciones. La cepa se identificó como un elemento del grupo de Staphilococcus epidermidis como sigue:

Discriminación primaria

(1)	Movilidad	
	37°C	(-)
	24°C	(-)
(2)	Manchado gram	(+)
(3)	Actividad de catalasa	(+)
(4)	Forma	coccus
(5)	Propiedad de resistencia a los ácidos	(-)
(6)	Formación de esporas	(-)
(7)	Desarrollo al aire	(+)
(8)	Actividad de oxidasa	(-)
(9)	Utilización de glucosa	(+)

(10) Ensayo de fermentación por oxidación

(Ensayo de Hugh-Leifson)

F.

De los resultados del ensayo anterior, se juzgó que el germen pertenece a *Staphylococcus* o *Aerococcus*.

Discriminación secundaria

(1)	Coagulasa	(-)
(2)	Reacción V-P	(+)
(3)	Reacción rosa	(-)
(4)	Fosfatasa	(+)
(5)	Reducción de nitratos	(+)

Por lo tanto, el germen se determinó finalmente que era *Staphylococcus epidermidis*. Los inventores la denominaron cepa "STF".

(2) Preparación del ingrediente activo:

El germen se propaga bien en un medio común, es decir un medio nutriente que contiene carbono, nitrógeno y sales inorgánicas. Para utilizar la sustancia activa útil producida por el germen, es deseable un cultivo aerobio en un medio líquido en estado estacionario o con agitación. Ejemplos de medios de cultivo adecuados se dan a continuación:

(1)	Peptona	17 g
	Extracto de caldo	3 g
	NaCl	5 g
	$K_2HPO_4$	2,5 g
	Glucosa	2,5 g
	Agua destilada	1 litro (pH 7,3)

(2) Líquido de maceración de maíz	6 g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	3 g
Extracto de levadura	2,5 g
Dextrosa	10 g
$\text{CaCO}_3$	2,5 g
Agua destilada	1 litro (pH 4,5)

Aunque antes solo se ponen como ejemplos medios líquidos, pueden también emplearse medios sólidos comunes.

Los gérmenes se cultivaron en el medio anterior a una temperatura de cultivo de  $-20^\circ\text{C}$  a  $+40^\circ\text{C}$  durante 24-120 horas. La temperatura óptima era aproximadamente  $37^\circ\text{C}$ . La superficie de la colonia era blanca y circular.

La solución de cultivo resultante se sometió a centrifugación y la materia sólida se separó hasta obtener una solución (en lo que sigue denominada "solución de cultivo"). La solución se sometió a varios experimentos.

### (3) Utilidad del ingrediente activo:

La solución de cultivo obtenida se administró a animales afectados por varias enfermedades inducidas obteniendo los resultados siguientes:

(1) Inhibición del tumor maligno causado por inoculación del virus de leucemia:

Se dividieron 30 ratones ICR en tres grupos. Dos grupos se inocularon con virus de leucemia de Friend y después se administró intraabdominalmente 0,1 ml/10 g/día de la solución de cultivo a un grupo inoculado du

durante 8 días, obteniéndose los efectos siguientes de inhibición de la hipertrofia del bazo.

	Peso del bazo (g)	Grado de inhibi- ción (%)
Grupo no infectado (Testigo)	0,124 ± 0,022	
Grupo infectado (Testigo)	0,724 ± 0,239	
Grupo infectado ad- ministrado con la solución de cultivo continuamente duran- te 8 días.	0,219 ± 0,039	84,9

(2) Inhibición del tumor maligno causado por inoculación de las células de leucemia.

Se inocularon células leucémicas de ratón L-120 en ratones BDF<sub>1</sub> para provocar un estado de leucemia inducida. Los ratones mueren en un período limitado de tiempo. Dos grupos de ratones comprendiendo cada uno seis ratones fueron inoculados con células L-120 y a continuación dicha solución de cultivo se suministró a uno de los grupos continuamente durante 5 días obteniéndose los resultados siguientes. La cantidad de la solución de cultivo dada fue la misma que en (1).

	Tiempo de muerte (días después de la inoculación)
Grupo no tratado	7, 7, 7, 7, 7, 7
Grupo tratado	7, 7, 7, 8, 8, más de 10

La relación grupo de ensayo/grupo testigo (relación de la prolongación de la vida) fue mayor del 112 (%).

(3) Efecto de control de las células del cáncer de Ehrlich:

Dos grupos de ratones ICR, comprendiendo cada uno 10 ratones se inocularon con células de tumor de ascitis de Ehrlich. La solución de cultivo se administró intraabdominalmente a uno de los grupos continuamente durante 5 días. Se reconoció el efecto de inhibición del número de células con tumor en el décimo día que es como se muestra a continuación. La cantidad de la solución de cultivo dada era la misma que en (1).

	Número de células con tumor	Grado de inhibición (%)
Grupo no tratado	$7,7 \times 10^8$	
Grupo tratado	$4,7 \times 10^7$	93,7

(4) Efecto de control de las células de Sarcoma 180:

De la misma forma que antes, dos grupos de ratones ICR comprendiendo cada uno 10 ratones fueron inoculados con células de Sarcoma 180 intraabdominalmente. La solución de cultivo se administró a uno de los grupos continuamente durante 5 días. Se examinó el número de células al décimo día obteniéndose los resultados siguientes. La cantidad de la solución de cultivo dada fue la misma que en (1).

	Número de células con tumor	Grado de inhibición (%)
Grupo no tratado	$2,3 \times 10^9$	
Grupo tratado	$5,3 \times 10^8$	76,9

Para comparación, se examinaron los efectos de las soluciones de cultivo de otros microorganismos bien conocidos obtenidos por el mismo método de cultivo. Soluciones de cultivo de los microorganismos bien conocidos siguientes se administraron a ratones inoculados con virus de leucemia de Friend. No se observó efecto en ninguno de los casos:

Pseudomonas

Klebsiella

Staphylococcus aureus

(4) Aislamiento y purificación del ingrediente activo:

El ingrediente activo contenido en la solución de cultivo de Staphylococcus epidermidis puede aislarse y purificarse por ejemplo por el procedimiento siguiente:

(1) La solución de cultivo se somete a centrifugación a 3000-12000 rpm durante 30-10 minutos para dividirla en solución y precipitado. A continuación, el precipitado se lava con agua destilada y de nuevo se somete a centrifugación. Las aguas de lavado se combinan con dicha solución. Este procedimiento se repite 1 a 5 veces (generalmente tres veces).

(2) La solución así recogida se concentra por evaporación a una temperatura de 10-30°C a presión reducida de 5-30 mm de Hg durante 1-6 horas y la sustancia sólida así precipitada se lava con agua destilada y luego se disuelve.

La solución se concentra de nuevo por evaporación. Este procedimiento se repite de 1 a 5 veces (generalmente tres veces) obteniéndose polvos cristalinos blanco parduzcos o amarillentos o blancos que son solubles en agua.

(3) Los polvos cristalinos se fraccionan empleando medios de separación, por ejemplo un tamiz molecular tal como Sephadex (un gel de filtración adsorbente producido por Biochemical Co., Suecia) G-25. Se examinan las actividades de las fracciones respectivas y la fracción activa se selecciona repetidamente. Por este procedimiento, se obtiene una sustancia que tiene un único pico de actividad.

El ingrediente activo se disuelve de nuevo en agua y se purifica por medios de purificación tal como cromatografía de intercambio iónico o diálisis.

(4) El ingrediente activo así purificado puede separarse por adición de diversos disolventes orgánicos a la solución acuosa, cambio del pH desde la región ácida a la región alcalina, salificación seguida por reprecipitación y filtración o concentración por evaporación.

La sustancia tiene las propiedades siguientes:

---

Estabilidad térmica	Estable (sustancia que no pierde su actividad después de haberse mantenido a 100°C durante 15 minutos)
Reacción de ninhidrina	(-)
Reacción de Ehrlich	(-)
Reacción de Sakaguchi	(-)

---

La actividad antimaligna del ingrediente acti-

vo así aislado y purificado se confirmó como sigue añadiendo una solución acuosa diluida del mismo a una solución de cultivo de células L-1210, cultivando las mismas a 35°C durante 48 horas y determinando el grado de inhibición de la propagación de las células.

Grado de dilución	Grado de inhibición ( % )	
	Lote A	Lote B
50	100	100
100	100	95,3
200	83,0	83,5
400	72,7	78,6
800	69,0	61,4
1600	59,1	56,4
3200	49,9	-

Por lo tanto, es evidente que la sustancia producida por *Staphylococcus epidermidis* tiene el efecto de controlar varios tumores malignos tal como los cánceres líquidos y los cánceres sólidos. La sustancia no presenta toxicidad aguda.

(5) Administración del ingrediente activo:

La dosificación es aproximadamente 3 - 300 mg/kg, aunque difiere dependiendo de la vía de administración. La solución de cultivo de la que se ha separado la materia sólida puede emplearse directamente. Sin embargo, como cosa natural, es mejor emplear el ingrediente activo aislado y purificado para controlar la dosificación con precisión. Son posibles diversas formas de administra

ción tal como inyección intravenosa, subcutánea, intracutánea o intramuscular, administración por vía oral, supositorios, pastillas y emulsiones. Por consiguiente, la forma de las preparaciones puede seleccionarse adecuadamente y puede ser tal como polvos, tabletas (tabletas de una capa, tabletas de dos capas, tabletas entéricas, etc), cápsulas, inyecciones cargadas en ampollas o viales, tabletas sublinguales, pastillas, supositorios o emulsiones grasas.

Descripción breve de los dibujos:

Las Figuras 1 - 4 muestran el espectro U.V. y el espectro I.R. de las fracciones obtenidas por un procedimiento mostrado en el Ejemplo 2.

La Figura 1 muestra el espectro U.V. de un ingrediente activo de un peso molecular de 5000-10000 (solución original diluida con agua en solución 1:10);

la Figura 2 muestra el espectro U.V. de un ingrediente activo de un peso molecular de 1000-5000 (solución original);

la Figura 3 muestra el espectro IR de un ingrediente activo de un peso molecular de 5000-10000; y

la Figura 4 muestra el espectro IR de un ingrediente activo de un peso molecular de 1000-5000.

Los ejemplos siguientes ilustran además el presente invento. Ha de entenderse que los ejemplos siguientes de ningún modo limitan el presente invento.

#### Ejemplo 1

Se cultivó *Staphylococcus epidermidis* STF a 37°C durante 48 horas en un medio de la composición siguiente:

Líquido de maceración de maíz	6 g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	3 g
Extracto de levadura	2,5 g
Dextrosa	10 g
$\text{CaCO}_3$	2,5 g
Agua destilada hasta 1 litro	(pH 4,5)

La solución de cultivo se sometió a centrifugación a 10000 rpm durante 30 minutos para dividirla en un líquido sobrenadante y precipitado. El precipitado se volvió a dispersar en un litro de agua destilada y la dispersión se dejó permanecer a 37°C durante 18 horas y a continuación se sometió de nuevo a centrifugación a 10000 rpm para dividirla en un líquido sobrenadante y un precipitado. Este procedimiento se repitió 5 veces. Los líquidos sobrenadantes resultantes se combinaron y concentraron por evaporación a presión reducida de 10 mm de Hg a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Después de que se alcanzó una concentración de aproximadamente 1/30, el líquido reunido se hizo pasar a través de una capa de Sephadex G-25 y se sometió a espectroanálisis U.V. empleando un indicador de DO (densidad óptica)<sub>265</sub>. La separación de la fracción implicó un método de detectar polisacáridos tal como la reacción de Molisch. Se examinó un cromatograma de la actividad de propagación-inhibición de la célula L-1210 y se separaron las fracciones activas. Este procedimiento se repitió tres veces obteniéndose la fracción de la actividad mayor. La solución acuosa de la fracción se concentró por evaporación obteniéndose polvos blancos. Los polvos se lavaron con agua, se disolvieron de nuevo y se concentraron por evaporación. Este procedi-

miento se repitió 5 veces obteniéndose polvos cristalin-  
nos blancos. El rendimiento de 1 litro de la solución de  
cultivo era aproximadamente 0,3 g.

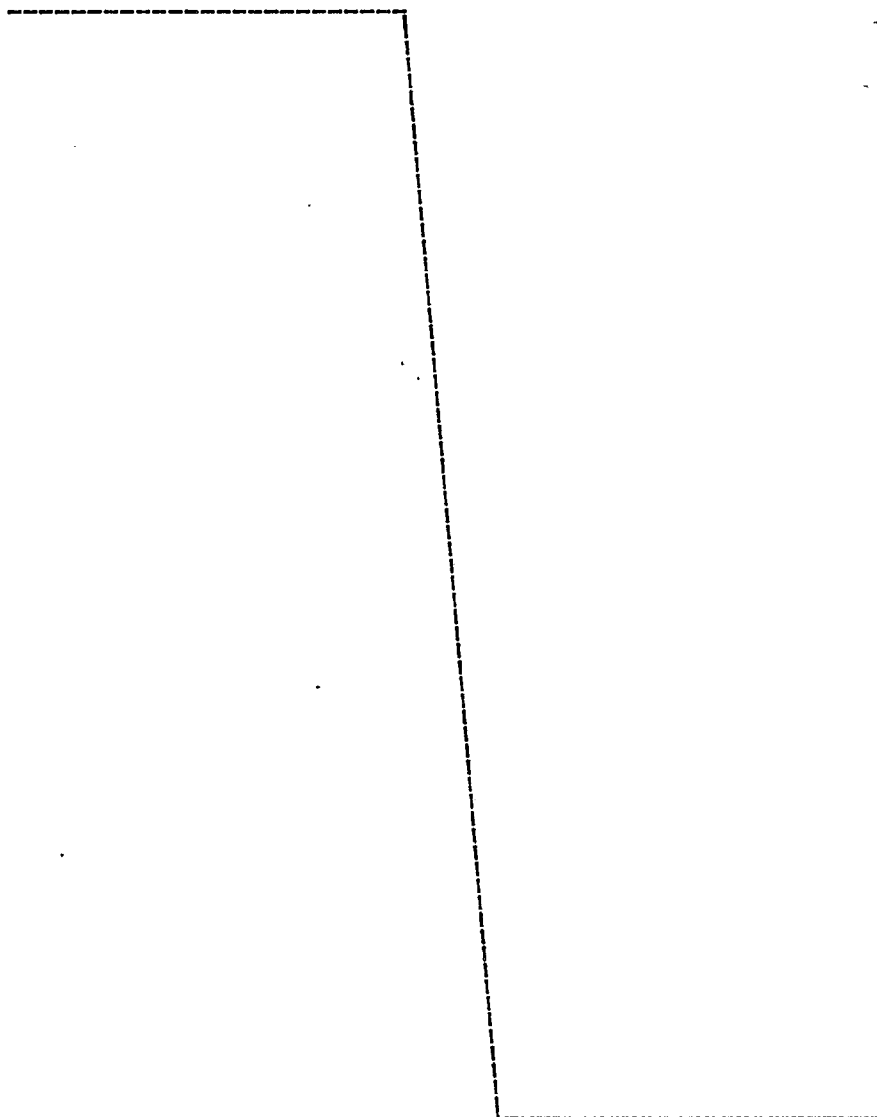
### Ejemplo 2

Se prepararon 25 litros de un medio líquido que  
tenía la misma composición que en el Ejemplo 1. El culti-  
vo se efectuó a 37°C durante 2 días. La solución de culti-  
vo se sometió a centrifugación (6000 rpm, 20 minutos) pa-  
ra separar los gérmenes. El líquido sobrenadante resul-  
tante (aproximadamente 23 litros) se concentró hasta un  
volumen de aproximadamente 500 cc a 40°C bajo presión re-  
ducida.

El precipitado así formado se lavó con 100 cc  
de agua destilada tres veces. Las aguas de lavado se com-  
binaron con el concentrado y el total se concentró a un  
volumen de 500 cc a 40°C bajo presión reducida. El con-  
centrado se dividió en dos fracciones (una que tenía pe-  
sos moleculares de más de 10000 y la otra que tenía pesos  
moleculares de menos de 10000) con Diaflon nº 10000 que  
es una membrana de tamiz molecular producida por Amicon  
Far East Ltd. La solución de pesos moleculares menores de  
10000 se hizo pasar a través de una columna de dietilami-  
noetilcelulosa (tipo OH<sup>⊖</sup>) para dividirla en sustancia  
ácida y sustancias neutras y básicas. A continuación, las  
sustancias neutras y básicas se dividieron además en dos  
fracciones (una que tenía pesos moleculares de 5000-10000  
(solución original) y la otra que tenía pesos moleculares  
menores de 5000) con Diaflon nº 5000. La fracción de pe-  
sos moleculares menores de 5000 se dividió además en dos

fracciones (una que tenía pesos moleculares de 1000-5000 y la otra que tenía pesos moleculares menores de 1000), con Diaflon nº 1000. El concentrado debía por tanto dividirse en fracciones respectivas. Se determinó el espectro U.V. y el espectro I.R. de cada una de las fracciones anteriores (véase Figuras 1-4).

A continuación, las fracciones respectivas anteriores se administraron a animales afectados por varias enfermedades inducidas obteniéndose los resultados siguientes:



(A) Efectos antimalignos de las fracciones de 5.000 <math>\text{PM}</math> <math>< 10.000</math> y 1.000 <math>\text{PM}</math> <math>< 5.000</math> contra las células de Leucemia L-1210 cultivadas in vitro:

Conc del 50% de inhi  
bición de propagación  
de las células CI<sub>50</sub> (mg/ml)

Grado de inhi  
bición (%)

Número medio de células +  
desviación típica ( $\times 10^4/\text{ml}$ )

Conc.  
(mg/ml)

Fracción

Grupo testi  
go de la cé  
lula con tu  
mor

14,1  $\pm$  0,49

-

-

1.000 <math>\text{PM}</math> <math>< 5.000</math>

9,9  $\pm$  0,97

29,8

0,25

8,5  $\pm$  0,19

39,7

1,0

4,9  $\pm$  0,13

65,2

2,0

3,7  $\pm$  0,33

73,8

0,70

5.000 <math>\text{PM}</math> <math>< 10.000</math>

2,6  $\pm$  0,93

81,6

0,50

1,8  $\pm$  0,15

87,2

1,0

0,8  $\pm$  0,001

94,3

<math>< 0,25</math>

(B) Efectos antitumorales de fracciones de 5.000 <PM < 10.000 y 1.000 <PM < 5.000 contra células de tumor de Ehrlich cultivadas in vitro:

Fracción	Conc. (mg/ml)	Número medio de células ± desviación típica ( $\times 10^4$ /ml)	Grado de inhibición (%)	Conc. del 50% de inhibición de propagación de las células CI <sub>50</sub> (mg/ml)
----------	---------------	--	-------------------------	--

Grupo testigo de la célula con tumor

0 80,4 ± 3,3

-

1.000 <PM < 5.000

0,25 58,7 ± 3,7

39,9

0,50 56,6 ± 3,1

43,8

1,00 49,7 ± 2,9

56,4

0,72

2,00 46,1 ± 2,3

63,1

5.000 <PM < 10.000

0,25 63,2 ± 1,5

31,6

0,50 52,4 ± 2,5

51,5

0,48

1,00 39,4 ± 2,5

75,4

2,00 37,7 ± 1,8

78,5

(C) Efectos antitumorales de las fracciones steven 5.000 < PM < 10.000 y 1.000 < PM < 5.000 contra las células de hepatoma AH 41C cultivadas in vitro:

Fracción	Conc. (mg/ml)	Nº medio de células + desviación típica (x10 <sup>4</sup> /ml)	Grado de inhibición (%)	Conc. del 50% de inhibición de propagación de las células CI <sub>50</sub> (mg/ml)
Grupo testigo de la célula con tumor	0	115,9 ± 1,52	-	-
1.000 < PM < 5.000	0,1	93,4 ± 1,85	19,8	
	0,5	93,5 ± 6,60	19,0	
	1,00	90,3 ± 2,74	22,4	> 2,00
	2,00	87,7 ± 7,94	24,1	
5.000 < PM < 10.000	0,1	118,9 ± 2,59	0	
	0,5	62,9 ± 3,35	45,7	
	1,00	27,3 ± 2,61	76,7	0,60
	2,00	23,4 ± 1,95	80,2	

(D) Efectos antimalignos de fracciones styeen 5.000 < PM < 10.000 y 1.000 < PM < 5.000 para ratones inoculados con células con tumor de ascitis de Ehrlich (influencia sobre el número de células completas con tumor en el 11º día después de la inoculación de las células):

Fracción	Cantidad (mg/kg)	Nº medio de células tumorales completas $\pm$ desviación típica (x10 <sup>7</sup> )	Grado de inhibición de propagación de las células (%)
Grupo testigo	0	115,4 $\pm$ 12,6	-
1.000 < PM < 5.000	200	28,4 $\pm$ 6,4	75,3
	400	31,2 $\pm$ 12,5	72,9
	600	29,0 $\pm$ 3,3	74,5
5.000 < PM < 10.000	200	47,1 $\pm$ 20,4	59,1
		55,1 $\pm$ 17,1	52,2
		42,2 $\pm$ 5,1	63,2

1

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Un procedimiento para preparar un agente antimaligno derivado del Staphylococcus epidermidis STF, que comprende cultivar Staphylococcus epidermidis STF (Depósito Bikoken Nº 3706) en un medio de cultivo líquido que contiene componentes de carbono, componentes de nitrógeno y sales inorgánicas, separar la materia sólida de la solución de cultivo, concentrar la solución restante, lavar el precipitado así formado con agua volver a disolver el precipitado, fraccionar la solución en un número de fracciones por medios de separación, seleccionar una fracción que presenta actividad antimaligna, concentrar la fracción, purificar más la fracción y separar el ingrediente activo.

15

20

25

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado porque el cultivo se efectúa a aproximadamente 37°C.

3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado porque la separación se efectúa empleando un gel de filtración adsorbente.

30

4ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado porque la separación se efectúa

23068

empleando un tamiz molecular.

5ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado porque la purificación se efectúa por cromatografía de intercambio iónico.

5 6ª.- Un procedimiento para preparar un agente anti maligno derivado del Staphylococcus epidermidis STF".

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

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

Madrid, 30.ENE.1979  
P.A.

Alberto de Elizaburu  
Por Poder,



15

20

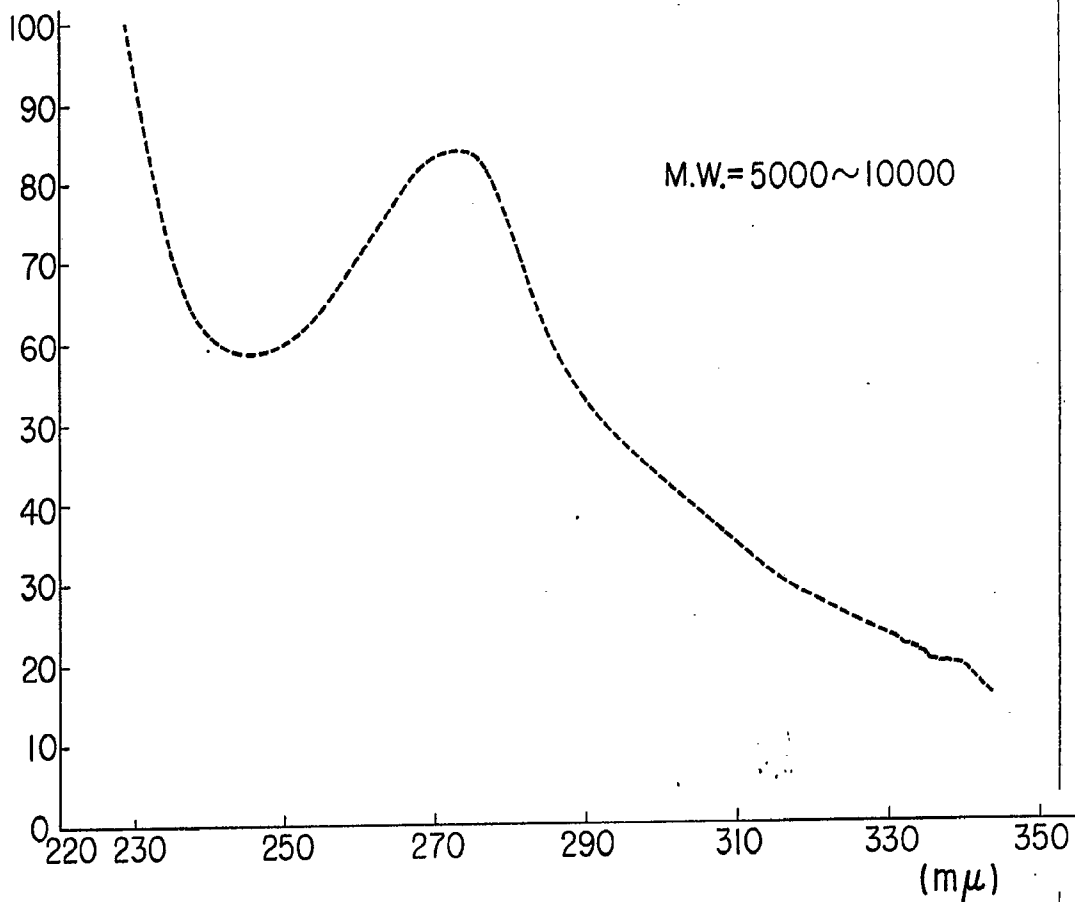
25

30

MRS



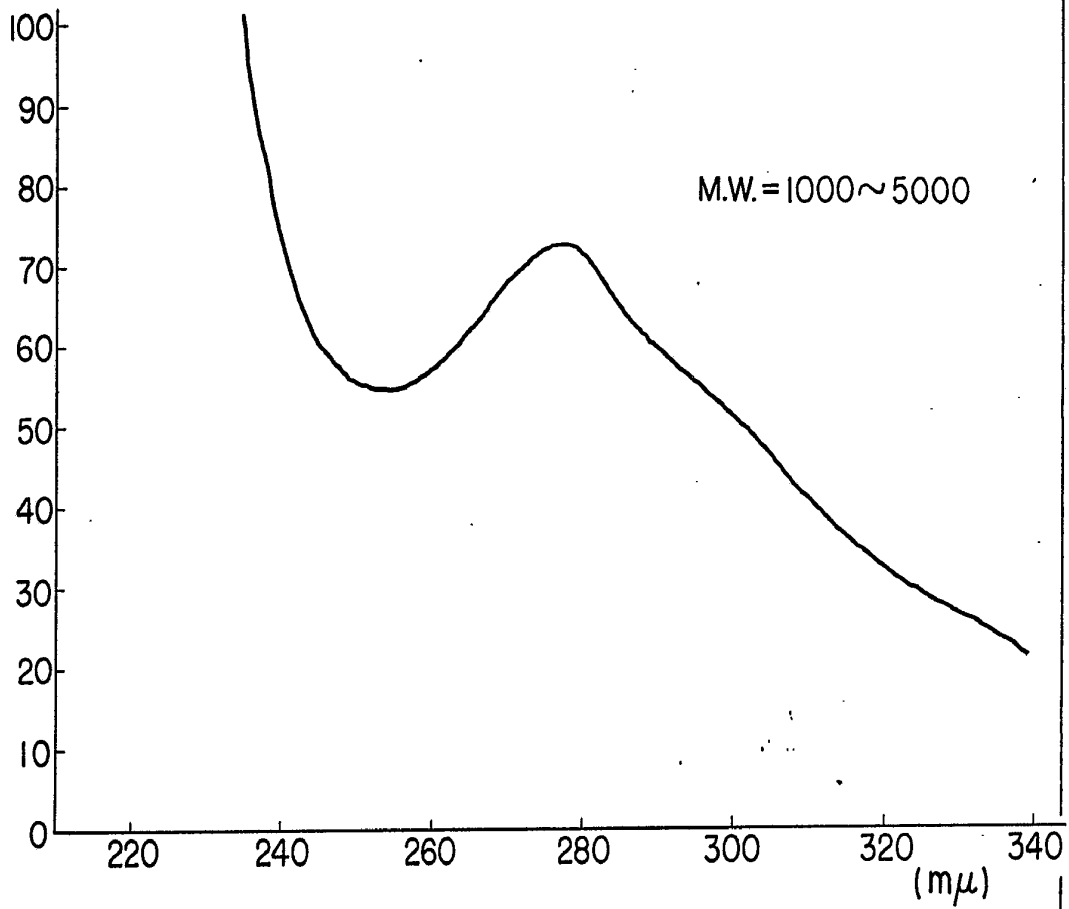
FIG 1



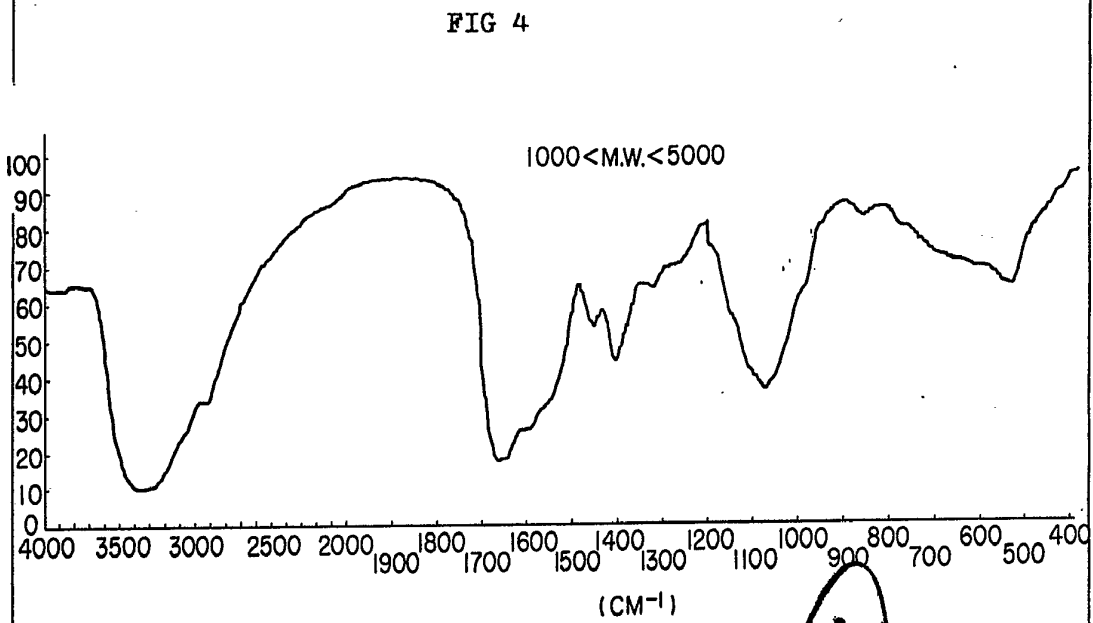
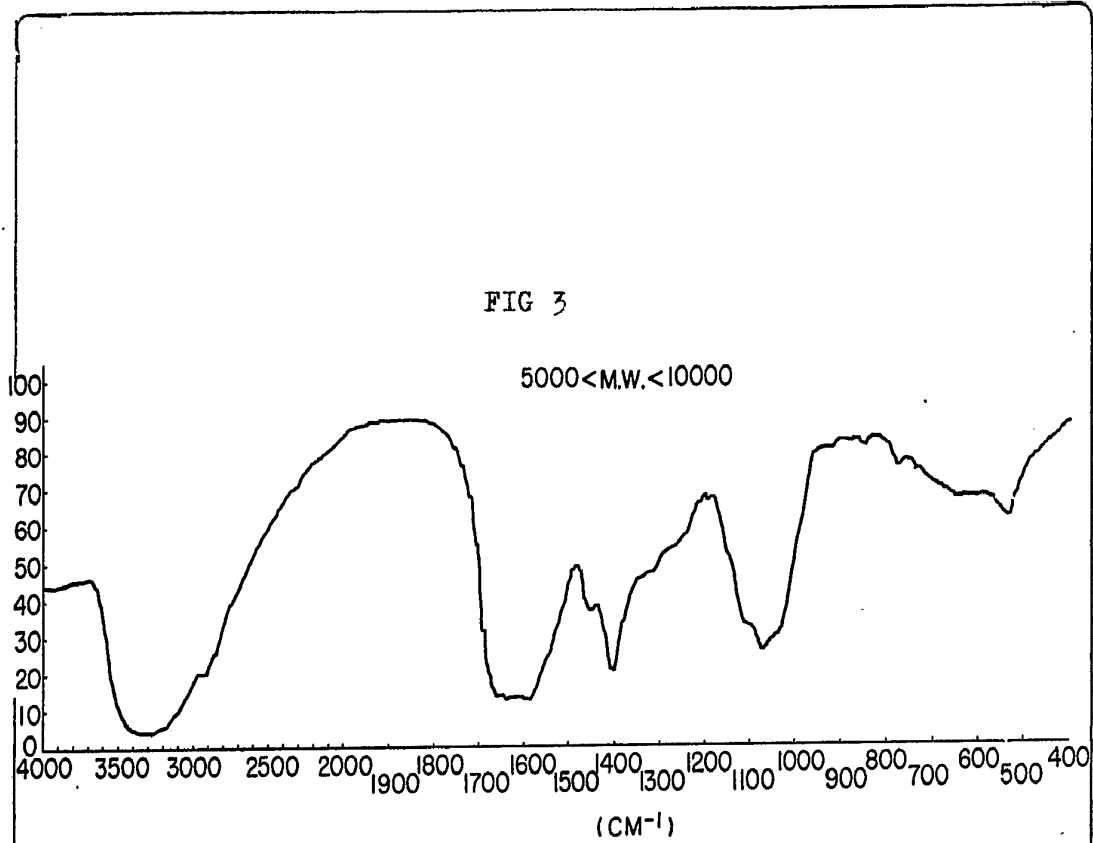
Alberto de Elzaburu  
Per Poder



FIG 2



Alberto d'Elizaburu  
For Power,



Alberto de Elzabur  
For Paul