

406820



PATENTE DE INVENCIÓN

Ordén nº 150

Int. Cl.º: A61K

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE GLUCOSA
FARMACOLOGICAMENTE ACTIVOS.

Solicitante: D. JOSE IGNACIO BLANCO CORDERO, de nacionalidad española,
residente en General Ricardos nº 21, MADRID.

La presente invención tiene por objeto un nuevo procedimiento para la obtención de compuestos farmacológicamente activos, particularmente útiles en el campo de las alteraciones fisiológicas, tales como procesos neoplásicos, degenerativos, procesos inflamatorios, etc.

5.



En la actualidad, el estado de la ciencia abarca tres vías convencionales para el tratamiento de los primeros, es decir de los procesos neoplásicos, como son:

5. a) técnica quirúrgica,
b) terapia por radiaciones, y
c) quimioterapia.

Aunque estas tres vías de tratamiento son ya harto conocidas, se describen a continuación, de forma somera, para fijar de forma matizada la finalidad de la presente invención.

10.

En principio, puede decirse que la ciencia médica desconoce la etiología de muchos procesos destructivos y fundamentalmente las neoplasias malignas, por lo que la aplicación de alguna de estas tres vías no constituye una solución definitiva, si bien presentan una eficacia relativa, especialmente cuando se trata de diagnósticos precoces.

15.

Cuando la neoplasia reviste caracteres de operabilidad, es la amputación la técnica quirúrgica electiva, tales como gastrectomía, mactectomía e histerectomías radicales ampliadas y linfadenectomías, que, a cambio de una posible curación, dejan al ser humano mutilado, deficitario y consciente de su propia disminución biológica y funcional. En adición, se puede decir que la radicalidad quirúrgica ha ido progresando hasta llegar a la hemicorporectomía.

20.

Con respecto a la segunda vía de terapia por radiaciones, se dispone en la actualidad de una gama amplísima de tales recursos. La roentgenterapia y la radiumterapia abrieron el camino a toda clase de radiaciones con fines curativos (isotopos variados, cobaltoterapia, alta energía, batatrón, etc.), encontrándonos de nuevo con la paradoja del tratamiento

25.

30.



- de las neoplasias malignas. Ante un agente desconocido, se utilizan energías poco dominadas y cuya matización resulta imposible frente a esa frontera, poco conocida, que marcan los límites entre tejidos sanos y tejidos enfermos. El corolario de este segundo paso terapéutico, son quemaduras brutales, fibrosis enormes, agotamiento y caídas de las constantes orgánicas.
- 5.
- Por último, la tercera vía (quimioterapia) en la lucha contra las neoplasias malignas, consiste en la utilización de medios extrínsecos, en este caso productos farmacológicos, en un intento de detener la evolución tumoral, que, como en las terapias anteriormente descritas, no resultan inocuos para el paciente, al tratarse de sustancias de alto grado de toxicidad, que ponen en marcha una auténtica agresión indiscriminada. Es probable que ejerzan un papel positivo contra el tumor, pero no es menos probable que los tejidos sanos sufran las consecuencias de su constitución química: vómitos, alopecia, leucopenias, anorexia y agotamiento general.
- 10.
- La finalidad central de esta invención viene como consecuencia de intentar el descubrimiento de una cuarta vía, es decir, el ataque a los procesos patológicos destructivos, mediante un procedimiento puramente biológico.
- 15.
- El principio de las investigaciones fué el de luchar contra los procesos invasivos de "dentro a fuera" y con unos postulados básicos de inocuidad respecto a efectos secundarios sobre el paciente. Se trataba de encontrar y potenciar, en principio, dentro del propio organismo humano los recursos para la lucha, e investigar profundamente los fenómenos biológicos trastornados por la enfermedad, procurando una vuelta a la normalidad de dichos fenómenos, y que la enfermedad fuera
- 20.
- 25.
- 30.



frenada, detenida e incluso curada.

La tesis es que, la reposición de determinadas características biofísicas y bioquímicas en un organismo alterado, probablemente daría como resultado global, una serie de actividades positivas (anti-inflamatorias, analgésicas, tónicas, etc.).

5.

El primer fundamento científico, y sobre el que hay que tratar de producir los efectos anteriormente mencionados, es el de la Célula.

10.

Los tejidos y los órganos humanos están constituidos por células de las mismas características, es decir, con idéntica constitución histológica que habrán de ejercer una función determinada y cuya desviación funcional produce unas manifestaciones patológicas diagnosticables.

15.

Si los disturbios son de pequeña intensidad, o el agente patógeno actúa durante breve tiempo, los mecanismos compensadores neutralizan el efecto, y en estos casos el tejido u órgano pueden acomodarse a la nueva situación sin provocar trastornos evidenciables inmediatos pero que pueden ser origen de futuras anomalías.

20.

Es ya conocido que los tejidos u órganos tienen un comportamiento que procede de sus constituyentes - las células - que a su vez tienen su propia función, y lógicamente su propio metabolismo.

25.

Ahora bien, esta función y este metabolismo no se producen de un modo aislado, sino que dependen del medio que rodea la célula y de sus relaciones con el resto orgánico, siendo por tanto de vital importancia que dicho medio sea normal y favorable.

30.

Cuando una célula se encuentra en un medio hostil,



5. utiliza las vías metabólicas compensadoras correspondientes (aún a expensas de un gasto energético importante) y tiende a adoptar las condiciones necesarias que le sitúen en condiciones óptimas de supervivencia y función. Sin embargo, las posibles transformaciones no son todo lo amplias como se quisieran.

10. Parece como si una vez iniciada la alteración primaria, en una determinada célula o grupo celular, se desencadenara una reacción del resto de todas las células componentes, no solo de las que forman parte del grupo de la afectada, sino de todo el sistema, de todas y cada una de las células distribuidas por todo el organismo que corresponden al mismo grupo histológico, en una acción coordinada para reparar la lesión, dando lugar a unos cambios biológicos o histo-fisiológicos, más o menos, en razón a la extensión e intensidad de la lesión, originando una igualdad de función de todas las partes, o tal vez unas manifestaciones biológicas y en ocasiones patológicas de todo el sistema celular afectado, visibles en su comienzo en las zonas de mayor actividad o responsabilidad anatómica o funcional.

20. Por tanto, admitida que la presencia del medio externo celular es de vital importancia, se debe seguir el perfecto equilibrio entre los dos lados de la membrana celular que es básico para toda función biológica. La vida orgánica es un proceso dinámico y las células están en permanente estado de actividad.

25. Los materiales que van a entrar a formar parte de la composición de las células, exigen su formación previa. A ambos lados de la membrana hay diferentes composición y concentración de sustancias que originan unas condiciones deter-

30.



- minadas, como son diferencia de potencial, fenómenos de difusión, variaciones de permeabilidad de la membrana, presión osmótica, tensión superficial (fuerzas cohesivas de Mathews), etc. Las concentraciones iónicas actúan sobre estos fenómenos
5. cuantitativamente, puesto que producen una carga igual a la suma de las cargas de las mismas (Micela iónica de Mc Bain), pero por otra parte tiene gran importancia la cantidad y clase de ión, ya que cualitativamente regulan importantes condiciones, como son la excitabilidad celular e incluso las respuestas específicas.
- 10.

Se hace ahora necesario hacer una somera descripción del medio extracelular, con el fin de conocer los caminos para su modificación cuando presente anomalías.

15. En el seno del líquido extracelular se producen las reacciones primeras que preparan y condicionan los componentes para permitir estar en condiciones de su ingreso en la célula. Las variaciones en la composición química del medio dificultarían o impedirían estas reacciones.

20. El reconocimiento del espacio extracelular y de sus condiciones químicas no es posible, y por tanto, no se puede constatar hasta que no se produce la alteración celular.

25. El equilibrio desaparece por múltiples causas, desde los pequeños o grandes traumatismos, hasta agresiones de la más diversa naturaleza, intoxicaciones, inflamaciones, agentes químicos, agentes patógenos, etc. Cuando el desequilibrio ocasionado compromete la supervivencia celular, hay una gran reacción que terminará con la muerte y la destrucción celulares, y la restitución en los tejidos en los cuales es posible, o la pérdida de función correspondiente. Cuando el
30. desequilibrio puede ser compensado, siguiendo otras vías, por



- la capacidad defensiva de las células, éstas se alterarán también buscando el equilibrio que necesitan y quedando todas sus funciones supeditadas a la nueva capacidad biológica adquirida, sin que el resto del organismo reaccione contra esta situación y, por tanto, no se observa ninguna defensa ni sintomatología, sino, por el contrario, una ayuda o colaboración, ya que aquella compensación es una respuesta biológica perfecta que entra dentro de la capacidad defensiva biológica y, por tanto, fisiológica de toda célula.
- 5.
10. La aportación de materiales al medio extracelular origina un desequilibrio que se compensa con una serie de reacciones bioquímicas, formando a veces nuevos cuerpos orgánicos que entran como tales en el proceso metabólico u otras uniones muy lábiles o simplemente ionizaciones cuyo efecto desaparece cuando cambian las condiciones físico-químicas del medio en que se encuentran y, por tanto el proceso metabólico comienza en el espacio extracelular.
15. No se puede abandonar el contemplar también el envejecimiento celular, con alteración progresiva de sus características físico-químicas, normalmente seguido de disminución de funciones, así como cambios morfológicos y estructurales, alteraciones manifestadas más importantemente por la deshidratación y la lentificación en el ritmo del crecimiento y división celular.
20. Los progresivos avances en el campo de la bioquímica ha permitido conocer, hasta lo posible, la constitución química y la concentración, en condiciones normales, de los espacios extra e intracelular para que el equilibrio y funciones fisiológicas sean perfectas. Pero, además, a través de los hallazgos conseguidos, se han establecido las vías metabólicas
- 25.
- 30.



- seguidas por los principios inmediatos en su largo camino a través del proceso degradativo y de asimilación. Todos los principios inmediatos comienzan su metabolismo en el momento de su ingreso a través de la vía digestiva, transformándose en su paso hasta terminar en unos productos finales que son eliminados a través de las diferentes vías de excreción. Sin embargo, hay centros o núcleos metabólicos en los que se relacionan los tres importantes principios, lípidos, Hidratos de Carbono y Proteínas.
- 5.
10. Previo también a la descripción del proceso, es necesario hacer algunas consideraciones sobre el medio intracelular.
- La célula está compuesta fundamentalmente, además de su membrana, del Citoplasma y del Núcleo. El Citoplasma presenta una serie de orgánulos que, con cometidos específicos de vital importancia, presentan una serie de actividades y de funciones algunas de ellas poco conocidas, tal como el metabolismo protéico y fundamentalmente la síntesis de proteínas, así como la de ambos ácidos nucleicos (DNA y RNA).
- 15.
20. Sería interesante, aunque puede encontrarse en estudios especializados sobre el tema, explicar las diversas funciones como: la formación de las cadenas de polinucleótidos, las secuencias de bases púricas y pirimidínicas, el fenómeno de síntesis de DNA mediante duplicación por separación de las dos cadenas que constituyen el modelo helicoidal, siguiendo su eje longitudinal, mediante una reacción catalizada por las enzimas nucleótido-polimerasa, en presencia de iones magnesio utilizando como sustrato trifosfatos de nucleótidos. Los trifosfatos de nucleótidos se forman a partir de monofosfatos
- 25.
30. de nucleótidos que sufren una reacción de fosforilación oxidada.



5. tiva, en la que el donante de ácido fosfórico es fundamentalmente el ATP, cuya fuente principal es la fosforilación oxidativa que tiene lugar en las partículas de las crestas mitocondriales. Estas reacciones están catalizadas por unas enzimas denominados transfosforilasas o nucleosidomonofosfatoquinasas. Todas las reacciones de transfosforilación son reversibles, y tienen un extraordinario interés en bioquímica, puesto que los derivados con dos o más moléculas de ácido fosfórico participan en procesos bioquímicos de gran importancia, mientras que los monofosforilados se cree que son inactivos.
10. Una de las constantes que más llamó la atención para la realización de esta invención, es el contenido de urea en sangre. Se sabe que, en condiciones de normalidad fisiológica, esta constante no se altera por el tipo de alimentación, edad, constitución, etc., lo que supone un esfuerzo orgánico importante en el mantenimiento de dicha constante, lo que significa que tiene que tener una importante significación fisiológica.
15. Se está formando y eliminando constantemente urea, lo cual hace pensar que aplicando el principio de la economía de la naturaleza, esta permanente producción y eyección con mantenimiento al mismo nivel, debe tener importantes aplicaciones dentro del organismo. Se piensa que realmente la importancia de la urea es tal, que su producción es continua y en gran cantidad, de tal forma que siempre esté presente en las proporciones necesarias para su utilización inmediata.
20. Por otra parte, la urea constituye la única forma de reserva de nitrógeno no tóxica conocida, puesto que la que se encuentra en las proteínas y aminoácidos forma parte de los mismos como tales, y el quitárselo significaría la destrucción de
- 25.
- 30.



aquellos.

5. Bies es verdad que se conocen algunos procesos metabólicos, como la transaminación, pero unicamente en un determinado sentido, y éstos, desde luego, no pueden justificar todo el metabolismo del nitrógeno.

10. Así, por ejemplo, según Kaletí y colaboradores, concentraciones determinadas de urea pueden inhibir los procesos de fosforilación de algunos compuestos en el organismo; tal es el caso de la formación del monofosfato de inosina (nucleotido) a partir de ATP e inosina (nucleosido), proceso catalizado por una enzima, la D. gliceraldehido - 3.P deshidrogenasa, cuya actividad se inhibe por urea 2 M, y a concentración superior a ésta, llega a inactivarse irreversiblemente la enzima.

15. Razonando sobre este tema, se hizo aparente que las proporciones sanguíneas de urea guardan relación aproximadamente molar con respecto a las concentraciones en sangre de glucosa es decir, el peso molecular de la urea es de 60, y el de la glucosa de 180 y las concentraciones de glucosa en sangre son tres veces superiores a las concentraciones de urea, lo que no pareció casual. Posiblemente urea y glucosa en determinadas condiciones reaccionan entre sí y con otras sustancias, formando nuevos cuerpos químicos y estas condiciones no se dan precisamente en el líquido sanguíneo, y por tanto es posible que ocurran en el espesor de los tejidos.

25. Las uniones químicas entre urea y glucosa, es probable que estén formadas por enlaces muy débiles que se rompan con facilidad al cambiar las condiciones del medio, separándose en sus constituyentes originales, lo que dificultaría enormemente su identificación y su aislamiento dentro de los tejidos.

30.



dos que se producen.

Se llega a relacionar la importante actividad del yodo que se encuentra distribuido en todo el organismo, precisamente en el espacio extracelular y sin acumulación en los tejidos patológicos.

5.

El tiroides capta el yoduro existente en sangre, lo transforma después en yodo y lo combina para formar monoyodotirosina y diyodotirosina. A base de estas dos se formarán respectivamente la tiroxina y la triyodotironina. En forma de tiroglobulina se almacena en la glándula tiroides que cede

10.

la hormona a la corriente sanguínea después de la acción enzimática de una proteasa que se encuentra en el tiroides. El yodo tiene unos efectos manifiestos sobre múltiples funciones orgánicas, como son el metabolismo basal, circulación, equilibrio hídrico, el crecimiento, la diferenciación, etc., lo

15.

cual se ha demostrado experimentalmente en organismos inferiores. Normalmente esto se produce en los organismos superiores por el papel del yodo en el metabolismo celular, cuya acción se cumple, posiblemente, por efecto indirecto sobre la respiración celular y sobre el intercambio de energía como consecuencia de provocar cambios en la estructura de la membrana mitocondrial.

20.

En los tejidos patológicos, el yodo actúa provocando la lisis de los tejidos enfermos con rápido alivio de la sintomatología (se debe a su efecto sobre el tejido granulomatoso y no sobre la causa etiológica).

25.

Algunos experimentos que se han hecho tanto en cobayas como en el hombre, demostraron que los yoduros tienen la propiedad de inhibir el poder antiproteolítico del plasma, factor éste que impide la acción de las enzimas proteolíticas.

30.



5. ticas que se encuentran en los tejidos granulomatosos y cuya misión es favorecer la lisis de los tejidos enfermos para su reabsorción posterior.

10. Por todo ello, y teniendo como base que el líquido intersticial es de composición similar al plasma a excepción de las proteínas plasmáticas, se piensa por el estudio químico del plasma que habría de conocerse el estado del líquido intersticial, y que, bajo condiciones normales, los componentes orgánicos del espacio extracelular no se difunden al interior de la célula. Se trata de interpretar lo que ocurriría en este espacio con sus componentes para que pueda producirse el equilibrio dinámico con el espacio intracelular y reproducir por tanto sus propios componentes partiendo de la base de la importancia de las proporciones moleculares de urea y glucosa y se ha tratado de hacerlas reaccionar entre sí, con una sal de magnesio en solución acuosa o salina fisiológica a la temperatura más normal dentro de los límites fisiológicos, es decir entre 36 y 40°C, y seguidamente añadir una sal de Iodo a la mezcla de reacción y acidificar la misma hasta un pH comprendido entre 2 y 4.

15. Por aproximación también se han utilizado diversos carbohidratos, especialmente aquellos cuya fórmula presenta entre 4 y 8 carbonos, con especial dedicación en las pentosas, así como los diferentes compuestos nitrogenados relacionados con la urea, entre ellos el ácido carbámico, carbamatos, cianamida, guanidina, etc., habiendo llegado al final de esta investigación a elegir como base firme y definitiva la glucosa y la urea.

20. La aplicación de otros yoduros y sales de magnesio y, por su evidente relación, el yoduro magnésico, demostró su

25. 30.



menor o nula eficacia.

5. También ha habido diferentes intentos en cuanto al modo de acidificar la reacción. Se utilizaron varios ácidos, tanto orgánicos como inorgánicos, pero en efecto, si bien variable en cuanto a intensidad, nunca fué comparable como cuando se utilizó el ácido benzóico, lo que supone un procedimiento más complicado y laborioso.

10. Las temperaturas de trabajo presentan unos márgenes de variación, así como el tiempo de reacción y de temperatura y depende uno de la otra de modo inverso. Parece ser que la temperatura ideal está más o menos en los 40°C, siendo posible utilizar inferiores temperaturas aunque no por debajo de los 10°C, pero para que la reacción se cumpla se necesitan tiempos mucho mayores. A temperaturas superiores a 40° comienza a disminuir la actividad del producto obtenido, acelerándose este crecimiento muy considerablemente cuando se pasa de los 55°C.

15. En cuanto a las cantidades de agua o solución salina, cuanto menos tenga que utilizarse mejores resultados se obtienen.

20. Se puede obtener el producto en dos formas de presentación finales, dependiendo de la forma de trabajo y de las diluciones empleadas, o bien un sólido obtenido por precipitación en solución diluida, o un líquido obtenido por separación espontánea en soluciones muy concentradas. Ambas formas son perfectamente válidas en cuanto a acción farmacológica, aunque la sólida presenta menor actividad.

25. A continuación se citan dos ejemplos que ilustren el procedimiento de esta invención, uno para la obtención de la forma sólida y el otro para la obtención de la forma líquida.

30.



da. Debe entenderse que los siguientes ejemplos son solamente ilustrativos de la invención y no limitativos del alcance y esencia de la misma.

EJEMPLO 1

5. En un recipiente de vidrio, se introducen 24,024 g (0,4004 moles) de urea y 24,5 g (0,1 moles) de $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, se mezcla y se homogeneiza, manteniendo la temperatura desde el principio en 40°C, durante 2 a 4 horas, en cuyo tiempo se forma una pasta transparente y viscosa. A continuación, se añaden
10. 72,0 g (0,4 moles) de glucosa y 300-400 ml de agua destilada o solución salina fisiológica, agitando lentamente hasta la total disolución, tras lo cual la solución se deja en reposo, durante 48 horas, a la misma temperatura de 40°C. (Opcionalmente, se pueden poner en contacto desde el principio la urea,
15. glucosa y $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sólidos, hasta la formación de la citada pasta, y añadir entonces el agua destilada o solución salina, o bien se pueden disolver la urea, glucosa y $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en el agua destilada o solución salina).
20. Seguidamente, se añaden 33,2 g (0,2 moles) de yoduro potásico, agitando hasta su total disolución, y 24 horas después se añaden 24,4 g (0,2 moles) de ácido benzóico en solución alcohólica sobresaturada, o bien directamente añadiendo después alcohol hasta su total disolución. En el primero de
25. los casos, adición de la solución sobresaturada de ácido benzóico, se forma un precipitado blanco, abundante, que se separa por filtración y que, después de disolver en cantidad suficiente de alcohol, se agrega al líquido de filtración, precipitando en el seno del mismo un polvo fino que se recoge nuevamente por filtración. En el segundo de los casos, se obtiene directamente el polvo fino activo, pero acompañado de
- 30.



mayor cantidad de impurezas. El polvo fino resultante posee un color amarillento, tiende a formar grumos y es perfectamente soluble en agua e insoluble en alcohol.

EJEMPLO 2

5. Para obtener la forma líquida se siguen los mismos pasos que para la forma sólida, disolviendo la mezcla de urea y sulfato magnésico y después glucosa, en 40 ml o menos de agua destilada o solución salina. Se añade directamente el ácido benzóico y seguidamente alcohol en una cantidad suficiente para la total disolución del mismo. Igualmente, el ácido benzóico puede añadirse en solución alcohólica sobresaturada.
10. Se mantiene el conjunto a 40°C. Se observa la formación de tres fases, una inferior sólida y dos líquidas, perfectamente separadas, en las que la intermedia es de color más intenso y de mayor viscosidad. Por estufado, se forman en la capa superior unas costras sólidas que se separan hasta la total desaparición de dicha capa, en cuyo momento se recoge, en un recipiente aparte, la fase intermedia líquida, la cual se lleva a temperatura ambiente. Debido al cambio de temperatura, esta fase líquida adquiere un aspecto cristalino, y transcurridos unos días, comienza a formarse en la parte inferior del recipiente un líquido transparente que aumentará progresivamente, hasta que por último se estabiliza en dos capas, una líquida inferior y otra sólida superior que se separan por
15. filtración, recogiéndose la fase líquida farmacológicamente activa. Este líquido tiene un color amarillo que varía de intensidad, es denso, oleoso y de olor y sabor característicos.
20. El producto obtenido por el procedimiento de la invención fué aplicado a animales al objeto de comprobar su toxicidad y su acción farmacológica sobre las constantes fisiológicas.
- 25.
- 30.



lógicas del animal, aplicándose también a animales portadores de tumores experimentales, utilizándose los tumores Krebs, Sarcoma S-37 y Ascítico de Erlich.

ENSAYO DE LA ACCION FARMACOLOGICA

5. Se estudia el efecto "in vivo" del compuesto obtenido por el procedimiento de la invención sobre Carcinoma Ascítico de Ehrlich (C.A.E.) en sus formas ascítica y sólida. El tumor se mantuvo en el laboratorio por pases sucesivos a ratones SWISS homocigóticos.
10. Se utilizaron en el experimento ratones hembras vírgenes SWISS, homocigóticos, procedentes de Charles River (París) - tipo CDL (R), no consanguíneos que descienden por cesárea (técnica COBS) de la cepa Ha/ICR Hauschka y Miranol, Roswell Park Memorial Institute - Swiss - entre 4-6 meses de edad y aproximadamente de 30 grs. de peso.
15. En todos los experimentos, las células tumorales fueron obtenidas por punción intraperitoneal, al octavo día de inoculación en el ratón, lavadas y suspendidas en solución salina isotónica, e implantadas en animales sanos según la técnica habitual.
20. Se atendió cuidadosamente para que las condiciones ecológicas y de alimentación fueran idénticas en todos los experimentos.
25. Todos los ratones fueron marcados para su identificación y se anotaron sus pesos al comienzo y a lo largo de toda la experiencia, determinando diariamente la media aritmética de cada grupo experimental y del grupo control.
- En los días 8 y 12 de la inoculación, se recogió por punción abdominal, líquido ascítico, para recuento celular.
30. Todos los animales muertos, tanto controles como ex-



perimentales, fueron necropsiados y estudiados macroscópica y microscópicamente.

5. Se siguieron dos criterios en nuestros experimentos, primero el control del crecimiento tumoral, dado por la curva de pesos, y la supervivencia de los animales tratados en relación con los controles. En dos de los experimentos, algunos de los animales fueron sacrificados durante la experiencia para su estudio micro y macroscópico.

10. Los tratamientos comenzaron en fechas diferentes en relación a la inoculación del tumor, variable entre 3 días antes de la misma y 3 días después. En algún grupo experimental se estableció unas dosis de compuesto activo en relación a la evolución del tumor, y en uno de ellos se dejó crecer el tumor durante 3 ó 4 días y se inició el tratamiento al incrementar el peso en 2 ó más gramos.

15. La cantidad de células tumorales inoculadas fueron de 1×10^6 , 2×10^6 y de 8×10^6 .

Se realizó una sola experiencia en tumores sólidos transplantados y enviados al laboratorio.

20. En los grupos experimentales que fueron inoculados con 1×10^6 y 2×10^6 células de C.A.E. intraperitonealmente, se observó una gran diferencia en el crecimiento tumoral entre éstos y el grupo control. Los grupos controles sufrieron un incremento entre el 40 % y el 50 % de su peso vivo inicial, mientras que los grupos experimentales tratados, el incremento nunca llegó al 20 % de su peso inicial vivo y que, en la mayoría de los experimentos, se reducen posteriormente hasta alcanzar los pesos iniciales.

25. Después de la muerte del último control, se consiguieron unas supervivencias que varían entre el 40 y el 70 por

30.



ciento de los animales tratados y que mantenidos en nuestro laboratorio, se conservan durante meses. Algunos de estos animales tienden a desarrollar un tumor sólido de pared, y en algún caso aislado, un tumor ascítico que termina con el animal, no antes de tres meses del comienzo de la experiencia.

5.

Los grupos experimentales inoculados con dosis de 8×10^6 células, sufren un incremento de peso durante los cinco primeros días, de aproximadamente 2-3 g. para después mantener este peso o decrecer ligeramente hasta el final de la experiencia. La supervivencia es menor que en los lotes inoculados con menor número de células y oscila entre el 20 y el 40 %.

10.

En dos experimentos inoculados con 8×10^6 células, se aplicó el tratamiento durante 3 y 4 días respectivamente y se controlaron los incrementos de peso y la supervivencia. El peso de los experimentales fue mucho menor que el de los controles y la supervivencia de los tratados solo alcanzó a 3 días.

15.

No se observaron diferencias cuando el tratamiento se inició 3 días antes de inocular el tumor. Si el tratamiento se interrumpe el día de la inoculación, el tumor evoluciona como en los grupos controles y si se continúa, se obtienen los mismos resultados que en las experiencias anteriores.

20.

En uno de los grupos, se administraron al inicio dosis pequeñas que se incrementaron hasta llegar a 100 mg. en cuyo momento se observó una caída brusca de la curva, que llega a alcanzar el peso de origen, pero en este caso la supervivencia es menor.

25.

Las dosis de compuesto activo utilizadas, variaron entre 2 y 100 mg. diarias (amplitud terapéutica que permite

30.



- la no toxicidad del preparado). Los resultados demostraron que existe una relación íntima dosis/tumor. En los animales cuyo tratamiento con dosis inferiores a 10 mg, por 30 g., se obtienen buenos resultados, cuando el número de células inoculadas es inferior a 2×10^6 . En concentraciones mayores de tumor es preciso tratar con dosis proporcionalmente superiores. Cuando el tratamiento se comienza 5-6 días después de la inoculación, no se obtuvieron respuestas con dosis pequeñas, fué necesario emplear cantidades superiores a 50 mg/días.
- 5.
10. En los tumores sólidos, se inició el tratamiento 10 días después de la implantación, cuando el tumor es mayor de 0,5x0,5 cm. Después de 3 días de tratamiento aparece una zona negra superficial por encima del tumor, que sigue creciendo normalmente durante los 10-12 días siguientes y posteriormente surge una limitación y pérdida de sus adherencias, aplanándose en su parte más profunda y comenzando finalmente su disminución hasta eliminarse una costra negra, debajo de la cual hay tejido de granulación que se resuelve sin dejar cicatriz.
- 15.
20. ANATOMOPATOLOGIA
- Los animales supervivientes sacrificados para su estudio, no presentaron ninguna anomalía macroscópica.
- En aquellos que fueron sacrificados durante la experiencia, se observó una distribución tumoral similar a los controles, destacando fundamentalmente la pequeña cantidad de líquido ascítico, el menor crecimiento del tumor y por tanto la menor intensidad de la invasión junto con un considerable aumento del tamaño del bazo y no invasión de hígado, bazo, riñones, etc.
- 25.
30. Microscópicamente los ratones supervivientes sacri-



5. ficados, no presentan células tumorales, hay intensa hiperplasia reaccional del SRE, (sistema reticuloendotelial) con hiperplasia de células de Kupffer del hígado, hiperplasia de folículos linfoides, congestión en riñón, hígado, bazo y en especial en pulmones.

10. En los animales sacrificados durante la experiencia, hay invasión neoplásica en la forma descrita en los trabajos de biología de C.A.E., pero con mucha menor intensidad que en los controles que fueron sacrificados en el mismo momento, llamando la atención la presencia de signos reaccionales a la presencia del tumor: Hipertrofia de Bazo (dependiente en especial de la pulpa blanca) y aparición de nódulos linfoides. También se observa congestión con vasos dilatados en todos los órganos.

15. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta las características toxicológicas y farmacológicas del compuesto activo se plantearon los experimentos partiendo de la inoculación de (1×10^6 y 2×10^6) células tumorales a cada animal.

20. Posteriormente y vistos los resultados en los experimentos anteriores, se aumentó el número de células inoculadas a 8×10^6 , cantidad extraordinariamente elevada, no utilizada normalmente en investigación oncológica. A pesar de estas condiciones, los resultados obtenidos han sido positivos en todos los casos, como demostró claramente el estudio de las gráficas de curvas de peso, de la supervivencia de los animales y del estudio anatómo-patológico; se ha comprobado que hay una relación directa entre el número de células tumorales inoculadas y las dosis de compuesto activo que deben administrarse, de tal forma que a mayor grado de invasión tumoral la do-

25.

30.



sis terapéutica de compuesto activo debe ser mayor.

5. Si se inicia el tratamiento 3 días antes de la inoculación y se suspende el mismo cuando se realiza ésta, se observó que no había diferencia en el desarrollo tumoral entre los animales tratados y los controles, lo cual parece indicar que el producto no tiene acción profiláctica cuando el tratamiento se realiza en periodos tan inmediatos a la inoculación.

10. Cuando el tratamiento se realiza limitándolo a 3 ó 4 días inmediatamente posteriores a la inoculación, obtenemos buenos resultados, si bien la supervivencia es menor que si los animales son tratados durante toda la experiencia.

15. Después del comienzo del tratamiento se observó que los grupos experimentales crecen normalmente durante los 5 ó 6 primeros días, estabilizándose posteriormente la curva y por último decreciendo para alcanzar los pesos originales; ésto parece indicar como si primero se produjera un control del crecimiento tumoral regulando su desarrollo y posteriormente sufrir una regresión y desaparición del tumor.

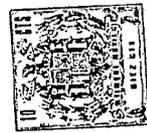
20. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA

Se efectuaron ensayos con los siguientes animales:
 - 210 ratones de las razas C3H y Faky de ambos sexos
 - 160 ratas de la raza Wistar de ambos sexos

25. Se calculó la dosis letal 50 (LD₅₀) por el método de Karber, (HOFFMANN G. Les animaux de laboratoire, págs. 244-245, así como la dosis letal 100 (DL₁₀₀) y la dosis máxima tolerable (D. Max. T.).

RATON:

30. El producto ensayado se administró por vía intramuscular, subcutánea e intraperitoneal, empleando 70 animales



por cada vía de administración y con dosis de 100 - 125 - 135 - 140 - 150 - 180 - 200 y 250 mg por 30 gr. de animal.

Los 210 animales tenían un peso total de 4.988,8 gr., y un peso promedio de 23,75 gr. por animal.

5.

T A B L A I

Vía administrac.	INTRAMUSCULAR		SUBCUTANEA		INTRAPERITONEAL	
	gr/kg	gr/60 kg	gr/kg	gr/60 kg	gr/kg	gr/60 kg
DL ₅₀	5,225	313,50	6,108	366,48	5,233	313,98
DL ₁₀₀	6,666	399,96	8,338	499,98	6,666	399,96
D. Max. T.	4,166	249,96	3,333	199,98	4,166	249,96

RATA:

10. El producto ensayado se administró por vía intraperitoneal, intramuscular y subcutánea, empleando 40 animales para la vía intraperitoneal, y 60 animales tanto para la vía intramuscular como para la vía subcutánea, y con dosis de 1000 - 1250 - 1500 - 1650 - 1800 y 2100 por 250 gr. de animal.

15. Los 160 animales de ambos sexos, tenían un peso total de 27.806,7 gr y un peso promedio de 173,7 gr. por animal.

T A B L A II

Vía administrac.	INTRAPERITONEAL		INTRAMUSCULAR		SUBCUTANEA	
	gr/kg	gr/60 kg	gr/kg	gr/60 kg	gr/kg	gr/60kg
DL ₅₀	4,900	294,00	6,800	408,00	--	--
DL ₁₀₀	6,000	360,00	--	--	--	--
D. Max. T.	4,000	240,00	5,000	300,00	6,000	360,000

Por vía intramuscular, no se ha podido hallar la DL₁₀₀ porque no se alcanzó la mortalidad total en los animales ensayados.

5. Por vía subcutánea no se han podido hallar las DL₅₀ y DL₁₀₀ por no haberse observado mortalidad suficiente en los animales ensayados para calcular dichas dosis.

CONCLUSIONES:

10. El producto ensayado es PRACTICAMENTE NO TOXICO según la clasificación establecida por Hodgé y Stemer (J. Europ. Toxicol., Vol. III, Jul-Ag. 1971).

ENSAYO DE TOXICIDAD CRONICA

15. El estudio de la toxicidad crónica se realizó en rata y hamster por vía intramuscular, durante un periodo de 3 meses, por administración repetida y a dosis diarias de 100 mg/kg.

20. Se emplearon ratas de la raza Wistar que tenían al comienzo de la prueba los animales control un peso medio de 255,8 g. y los animales problema de 242,2 gr, y hamster de la raza Aureus con un peso medio los animales control de 143,2 g. y los animales problema de 143,9 g., al comienzo de la prueba.

Se realizó una administración diaria por inyección intramuscular, alternativa en las patas posteriores y a razón de 100 mg. del producto ensayado por kg. de peso.

25. A los animales control, se les administran las mismas dosis que a los animales problema, pero solamente del excipiente que sirve de disolvente o vehículo para el producto que se estudia.

RESULTADOS

30. La mortalidad durante la prueba realizada ha sido en la rata, de 1 animal control, y de un animal problema,



estas muertes ocurrieron al comienzo del ensayo y verificada la autopsia no reveló alteraciones macroscópicas de ningún órgano, por lo que se puede decir que dichas muertes fueron accidentales o por enfermedad (Pneumonías, otitis) y sin ninguna relación con el tratamiento.

5.

En los hamsters, no hubo mortalidad.

Por lo demás, no se observó a lo largo de la experiencia, ninguna modificación del comportamiento general de los animales.

10.

Su apetito y la consistencia de las materias fecales, fueron normales.

La curva ponderal, fué registrada en los animales control y en los animales problema, cuyos datos se pueden comprobar en la tabla siguiente.

Tiempo en Semana	ANIMAL			
	Rata		Hamster	
	Control [#]	Problema ^{##}	Control [#]	Problema ^{##}
t = 0	265,1	242,2	143,2	143,9
t = 1	264,9	240,8	142,0	143,5
t = 2	262,7	232,5	136,5	138,7
t = 3	270,3	244,7	128,5	135,9
t = 4	264,8	241,9	135,8	137,5
t = 5	260,6	237,7	134,5	133,7
t = 6	269,5	242,8	125,5	130,7
t = 7	270,4	247,3	126,6	130,0
t = 8	264,6	239,5	119,6	127,1
t = 9	268,1	236,2	121,7	129,0
t = 10	264,5	231,6	118,1	127,6
t = 11	256,0	233,0	114,4	126,6
t = 12	263,0	227,6	111,6	120,7

Peso en g. al curso del tratamiento



*) 100 mg/kg de disolvente por vía intramuscular

*) 100 mg/kg de producto por vía intramuscular.

En los exámenes necropsícos verificados periódicamente se observa:

5.

Disminución de peso, en la masa visceral total de los hamsters problema, con respecto a los hamsters control.

En las ratas problema hay un aumento de peso en la masa visceral total con respecto a las ratas control.

10. Macroscopicamente, los animales control, tanto ratas como hamsters presentaban un aspecto normal, excepto que tanto en la cavidad torácica como en la cavidad abdominal, se apreciaba la existencia de exudado.

En las ratas problema, macroscopicamente, se observó:

15.

- Pulmones: algo congestionados.
- Paquete intestinal: disminuida su consistencia natural.
- Hígado: presenta una tonalidad negruzca en los bordes de sus lóbulos.
- Cavidad torácica y abdominal: existencia de exudado.
- Resto de órganos: Normales.

20.

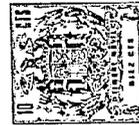
En los hamsters problema, se observa macroscopicamente:

25.

- Pulmones: vascularizados.
- Hígado: ligeras alteraciones de coloración.
- Riñones: Cápsula renal con superficie arrugada y aspecto granuloso.
- Bazo: Tonalidad negruzca en su totalidad.
- Intestino delgado y grueso: Disminuida su consistencia natural.

30.

- Cavidad abdominal y torácica: Exudado
- Genitales: Ligeramente disminuidos de volúmen.



CONCLUSIONES

5. Durante un periodo de tres meses, se ha administrado a ratas y hamsters, por vía intramuscular en dosis únicas y diarias, 100 mg/kg, que representan dos veces la dosis terapéutica recomendada.
- A parte de las dos muertes ocurridas por accidente o enfermedad, a lo largo de la prueba no se ha comprobado ningún síntoma patológico, ni modificación del comportamiento general de los animales.
10. La administración prolongada del compuesto activo en la rata y hamster en lo que concierne a la inocuidad y a la tolerancia general, revela que el producto ensayado es PRACTICAMENTE NO TOXICO, así como la tolerancia e inocuidad son SATISFACTORIAS.
15. N O T A
=====
- Descripta suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental, siendo lo que constituye la esencia del referido invento por lo que se solicita Patente de Inven-
ción por 20 años, en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA OB-
TENCION DE DERIVADOS DE GLUCOSA FARMACOLOGICAMENTE ACTIVOS;
caracterizándose por lo siguiente:
25. 1.- Procedimiento para la obtención de derivados de glucosa farmacologicamente activos, caracterizado porque:
- en una primera etapa, se pone en contacto urea con sulfato magnésico heptahidratado, en una relación molar de 1:0,06 -
0,5 a una temperatura comprendida entre 10 y 55°C aproximada-
mente, se mezcla y se homogeneiza hasta la formación de una
- 30.



- pasta transparente y viscosa;
- en una segunda etapa, se añade glucosa a la pasta resultante, en una proporción tal que la relación molar urea:glucosa sea de 1:1, en presencia de agua destilada o solución salina fisiológica, se agita lentamente y se deja en reposo a la misma temperatura comprendida entre 10 y 55°C; y
5. - en una tercera etapa, se añade a la solución resultante yoduro potásico en una proporción tal que la relación molar urea:IK sea de 1:0,25-1, se agita hasta la disolución total
10. y a continuación se acidifica la solución a un pH de 2-4, mediante la adición de ácido benzoico en una proporción tal que la relación molar urea:ácido benzoico sea de 1:0,25-1.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque durante la primera etapa y hasta el final del proceso, la temperatura se mantiene preferentemente en 40°C.
15. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la primera etapa se lleva a cabo en un tiempo de 2 a 4 horas, en función de la temperatura.
- 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la segunda etapa se realiza en presencia de 300 a 400 ml aproximadamente de agua destilada o solución salina fisiológica.
20. 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque en la tercera etapa la adición del ácido benzoico se efectúa en solución alcohólica sobresaturada.
25. 6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque en la tercera etapa, la adición del ácido benzoico se efectúa directamente, tras lo cual se añade alcohol hasta su total disolución.
30. 7.- Procedimiento según la reivindicación 1 y 4,

406320



caracterizado porque se disminuye la cantidad de agua destilada o solución salina fisiológica.

5. 8.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque la cantidad de agua destilada o solución salina se rebaja preferentemente hasta 40 ml aproximadamente.

9.- Procedimiento para la obtención de derivados de glucosa farmacológicamente activos, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

10. Esta Memoria consta de 28 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 2 AGO. 1973

Dr. Jose Ignacio Blanco Cordero.

COMPAÑIA ANONIMA Y ROYAL
p. p. Firmado: L. Costa Fernández