

385461

385461

SECCION TECNICA

CLASIFICACION I. C.

REC 07 A 61

CLASE D B



12

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

por VEINTE años

en España, a favor de ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU  
KENKYU KAI, entidad japonesa, establecida en No. 14-  
23, 3-chome, Kamiosaki, Shinagawa-Ku, Tokyo, JAPON -  
cuya Patente de Invención se refiere a:

"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION Y PREPARACION DE UN NUEVO AGENTE HIPOTENSOR".

.-----oOo-----.

M E M O R I A   D E S C R I P T I V A

Esta invención se refiere a un nuevo agente hipotensor llamado oudenona y comprende los correspondientes procesos para la producción y preparación del mismo. Más particularmente, se refiere a los procesos para su producción por fermentación y a los procesos para su recuperación y purificación. Esta invención abarca este agente hipotensor y sus sales en soluciones diluidas, así como concentrados crudos, sólidos crudos, sólidos purificados y en formas cristalinas puras. Esta sustancia es efectiva para inhibir el

5.-

10.-

385461



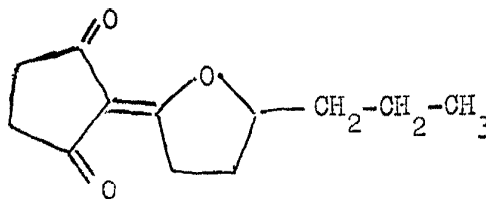
crecimiento de la hidroxilasa de tirosina y para --  
disminuir la presión sanguínea. Esta sustancia es -  
útil para el tratamiento de enfermedades hipertensi  
vas.

- 5.- Se proporciona, según la presente inven--  
ción, un agente hipotensor y sus sales, efectivos -  
para inhibir la hidroxilasa de tirosina y reducir -  
la presión sanguínea, siendo dicha sustancia hipo--  
tensora soluble en agua, metanol, etanol, propanol,  
10.- butanol, acetona, metilisobutilquetona, acetato de  
etilo, acetato de butilo, cloroformo, benceno e in-  
soluble en éter, hexano, éter de petróleo, mostran-  
do un máximo a 246 m $\mu$  en la solución de tampón de -  
fosfato (pH 7,0) y dos máximos a 221 m $\mu$  y 285 m $\mu$  en  
15.- su solución de 0,1 NHCl, dando reacciones positivas  
a los reactivos 2,4-dinitrofenilhidracina y tetrazo  
lium, pero reacciones negativas a los reactivos de  
Fehling y Tollens, dando cristales que se funden a  
77 - 79°C, siendo ópticamente activo ( $[\alpha]_D^{20} = 10.$   
20.-  $6^\circ$  en 0,5% etanol), mostrando alrededor de 4,1 de -  
pK' por titulación de la solución acuosa, teniendo -  
la fórmula molecular de C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>, mostrando bandas  
de absorción características en la región infrarro-  
ja del espectro cuando se prepara en píldoras con -  
25.- bromuro de potasio en los siguientes números de on-  
da en cm<sup>-1</sup>: 3400, 2900, 1710, 1660, 1560, 1455, 1420,  
1380, 1300, 1270, 1255, 1195, 1170, 1130, 1100, 1050,  
1015, 990, 980, 955, 935, 895, 885, 860, 840, 820,-  
810, 780.  
30.- La oudenona que se cristaliza a partir --

385461



del hexano tiene la estructura siguiente:



5.-

La figura 1ª indica el espectro de absorción ultravioleta de la oudenona 5 mcg/ml/ en tampón de fosfato de pH 7,0 y 0,1N HCl.

10.-

La figura 2ª indica el espectro de absorción infrarroja de la oudenona preparada en píldoras en bromuro de potasio.

15.-

La figura 3ª indica el espectro infrarrojo de la oudenona de potasio  $C_{12}H_{17}O_4K$  (KBr) formada en píldoras en bromuro de potasio.

20.-

Se proporciona además, según la presente invención, el proceso para producción de la oudenona que incluye el cultivo de un microorganismo productor de la oudenona en un medio acuoso conteniendo fuentes de carbón y fuentes de nitrógeno en condiciones aeróbicas hasta la acumulación de una cantidad importante de oudenona en dicha solución. La oudenona en el caldo de cultivo puede mostrarse por la determinación espectrofotométrica o por la actividad para inhibir la hidroxilasa de la tirosina.

25.-

La oudenona es un nuevo compuesto descubierto por los presentes inventores. El organismo que produce la oudenona fué descubierto por primera vez por los inventores de la presente y se recogió bajo los árboles de hojas de aguja en Kirizumiyana en la prefectura de Gumma. Es un tipo de seta. Se -

30.-

385461

12



- 5.- cultivó y se denominó cepa 10G en el instituto de los inventores (Instituto de Química Microbiana, -- Shinagawa-Ku, Tokyo). Ha sido depositado en Kogyo Gijutsuin, Hakko Kenkyujo en la prefectura de Chiba y agregado a su colección permanente como el número 503. Forma el cuerpo del fruto cuando se cultiva en un medio de polvo de serrín (10 g. de serrín se mezcló con 60 cc. de un medio conteniendo 2,0% de glucosa y 0,5% de levadura seca, situado en un frasco de 500 cc. de medio, y esterilizado a 120°C durante 20 minutos) a 27°C. El cuerpo del fruto así formado es el tipo Collybia. El Pileus (sombrero) es de 4 - 11 cm. de diámetro. Al principio el pileus es convexo y a continuación se abre y se hace plano y la parte central del pileus se levanta ligeramente. --
- 10.- Cuando está húmedo, la superficie mucosa y marrón clara o marrón clara grisácea. Se observan venas (arrugas) en forma radial o de red. La lamella (laminillas) es suelta, blanca o blanca amarillenta y está unida directamente al pie. La parte interior del pie es hueca y las esporas blancas. Comparándolas con las setas conocidas, la familia 10F tiene propiedades comunes con la Oudemansiella y entre las tres especies conocidas de Oudemansiella, se parece más a la Oudemansiella radicata.
- 15.-
- 20.-
- 25.-

30.- Las setas se clasifican por su morfología del cuerpo del fruto, pero no es completamente cierto de que el cuerpo del fruto que se forma en el medio artificial sea totalmente idéntico al de la naturaleza. La cepa 10F, cuando se examinó su precoz

385461

12



5.- crecimiento en el medio de serrín descrito arriba, se asemejaba a la Pseudohiatula ohshimae, Hongo y - Matsuda. No obstante, cuando creció totalmente, como se describe arriba, se clasificó como Oudemansiella radicata. Se ha sabido que el mismo compuesto se encuentra a menudo en material cultivado de diversos hongos y diversas setas. Según la presente invención se proporciona ahora el método espectrofotométrico de determinación de la oudenona, y es fácil encontrar oudenona en materiales cultivos de microorganismos.

10.- La presente invención proporciona también los procesos para recuperación y purificación de la oudenona. El método espectrofotométrico de determinación de la oudenona es también útil para establecer el proceso eficiente para la extracción y purificación. Las palabras "cepa productora de oudenona" empleadas en la presente invención, abarca la cepa 10F y todas las variantes y mutantes de la misma. -  
15.- Abarca todos los organismos que producen oudenona - y que no pueden diferenciarse definitivamente de la cepa 10F, sus variantes y mutantes.

20.- Según la presente invención, la oudenona se produce cultivando aeróbicamente la cepa productora de oudenona. Es posible el cultivo en un medio sólido, pero para la producción de grandes cantidades se prefiere el cultivo en medio líquido. Por --  
25.- ejemplo, se cultiva la cepa 10F en un plano inclinado de agar formado por 2,0% de glucosa, 0,5% de levadura seca, 1,5% de agar (esterilizado a 120°C --  
30.-

3854612



- durante 20 minutos, pH sin ajustar, y pH después de esterilización era de aproximadamente 5,6) y el crecimiento micelial en el plano indicado de agar se inocula a un medio en el que se produce oudenona.
- 5.- Hay otro método eficiente de inoculación: la cepa productora de oudenona se cultiva en un medio de serrín como se ha descrito arriba a 27°C durante 10 - 20 días, el medio incluyendo el micelio se suspende en un medio fresco (el formado por 2,0% de glucosa y 0,5% de levadura seca), y la suspensión se inocula a un medio en el que se produce oudenona.
- 10.-
- Es también posible el inocular el caldo de cultivo obtenido agitando el cultivo o la fermentación aireada profunda a un medio en el que se produce oudenona. La cepa productora de oudenona puede crecer a 20 - 35°C, pero es preferible cultivar la cepa productora de oudenona a 25 - 20°C para producción de oudenona. Para cultivar la cepa productora de oudenona, pueden emplearse materiales conocidos como nutrientes para microorganismos. Por ejemplo, glucosa, maltosa, dextrina, almidón, lactosa, sucrosa, glicerol o ácido acético, así como la fuente de carbón. Agregando las siguientes fuentes de carbón al medio basal consistente en 0,5% de peptona, 0,3% de levadura seca, 0,3% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1%  $\text{NaCl}$ , se examinó la producción de oudenona en medios conteniendo diversas fuentes de carbón por el cultivo de agitación a 27°C para 14 días. La cepa productora de oudenona cultivada en el medio de serrín durante 14 días a 27°C se suspendió en un me
- 15.-
- 20.-
- 25.-
- 30.-

385461<sup>12</sup>N



- 5.- H<sub>2</sub>O formado por 2,0% de glucosa y 0,5% de levadura seca y 10 cc. de la suspensión se inoculó a cada medio de 120 cc situado en frasco de 500 cc. A continuación, la producción de oudenona (mcg/cc) en el líquido cultivado y el crecimiento (crecimiento abundante +++, crecimiento medio ++, ligero crecimiento +) fueron los siguientes: glucosa: 59 mcg/cc en 7 días, 300 mcg/cc y +++ en 10 días. maltosa: 7 mcg/cc en 7 días, menos de 5 mcg/cc y ++ en 10 días; --
- 10.- dextrina: 12, 5 mcg/cc en 7 días, menos de 5 mcg/cc y ++ en 10 días; almidón 5 mcg/cc en 7 días, menos de 5 mcg/cc y ++ en 10 días; lactosa: 25 mcg/cc en 7 días, 100 mcg/cc y + 10 días; sucrosa: 14 mcg/cc en 7 días, 215 mcg/cc y +++ en 10 días; glicerol: --
- 15.- 19 mcg/cc en 7 días, 215 mcg/cc y +++ en 10 días; acetato de sodio: menos de 5 mcg/cc en 7 y 10 días, 18 mcg/cc y + en 15 días. Pueden utilizarse aceites vegetales tales como aceite de soja, aceite de sésamo, etc., y grasas animales tales como aceite de tocino, etc., para la producción de la fuente de carbón y también como agente antiespuma. La oudenona está formada por carbono, hidrógeno y oxígeno, y no contiene nitrógeno. No obstante, pueden emplearse materiales nitrogenosos que se sabe que son útiles
- 20.- para el crecimiento de microorganismos, para cultivar la cepa productora de oudenona. Por ejemplo, --
- 25.- peptona, extracto de carne, levadura, extracto de levadura, harina de soja, harina de semilla de algodón, harina de cacahuete, licor de maíz, salvado de
- 30.- arroz y materiales nitrogenosos e inorgánicos pueden



385461<sup>12</sup>

emplearse para cultivar la cepa productora de oudenona. Por ejemplo, se produjo oudenona por cultivo en agitación de la cepa productora de oudenona en los medios siguientes: medio A, formado por dos por --

5.- ciento de glucosa, 0,5% de peptona, 0,3%  $KH_2PO_4$ , - 0,1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (no se ajustó el pH); medio B formado por 2,0% de glucosa, 1,0% de licor de maiz (pH 5,6); medio C formado por 2,0% de glucosa, 1,0% de harina de soja, 0,5% de levadura seca (pH 5,6). Cada

10.- medio de 125 cc. se situó en un frasco de 500 cc. de volumen y se inoculó la cepa productora de oudenona que creció en el medio de serrín. A continuación la producción de oudenona y el pH fueron los siguientes:

Días	Medio A		Medio B		Medio C		
	pH	mcg/cc	pH	mcg/cc	pH	mcg/cc	
5	4.4	11	4.8	5	4.4	15	
7	4.4	5	4.4	12	4.4	64	
8	4.4	11	4.8	29	4.4	88	
20.-	11	4.4	62	4.6	100	5.0	95
	12	4.8	158	5.0	215	4.8	229
	15	5.2	180	5.2	255	5.6	475

Como muestran los ejemplos descritos arriba, la peptona, el licor de maiz, la harina de soja, la levadura seca, son ejemplos de fuentes de nitrógeno apropiadas para la producción de oudenona. La harina de cacahuete, la harina de semilla de algodón, la caseína y los hidroxilatos de caseína se encontraron que también eran fuentes apropiadas de nitrógeno para la producción de oudenona. Es posible igualmente agregar sales

25.-

30.-

385461<sup>12</sup>



inorgánicas, si es necesario, se agrega una pequeña cantidad de sales de metales pesados.

5.- Para la producción de oudenona por fermentación, pueden emplearse los procesos de fermentación utilizados para la producción de antibióticos. Por ejemplo, se produce por cultivo de agitación o por fermentación profunda aireada, y se agregan -- agentes antiespuma tales como aceites vegetales, -- grasas animales o resina de silicona.

102.- La oudenona puede determinarse probando su actividad para inhibir la hidroxilasa de tirosina. El método se ha descrito en el Journal of Antibiotics 21, página 350 - 352, 1968. La presente invención ha inventado un método espectrofotométrico

15.- para determinación de la oudenona: una solución de la oudenona que debe probarse se diluye con tampón de fosfato 1/15 M de 7,0 de pH (el tiempo de dilución es n) y la densidad óptica (a) de la solución diluida en una cubeta de un cm. se lee a 246 mμ;

20.- la solución que debe probarse se diluye con 0,1N HCl - (los tiempos de dilución es n) y la densidad óptica (b) se lee en una cubeta de 1 cm. a 246 mμ; la cantidad de oudenona en la solución probada se calcula como sigue:

25.- 
$$\frac{(a - b)n \times 10^4}{1000-60} = \text{mcg/cc de oudenina en la solución}$$

30.- Cuando la cepa productora de oudenona se cultivó en un medio líquido, la oudenona existe tanto en la parte líquida como en la parte sólida del caldo de cultivo. Por ejemplo, cuando se cultivó --

385461

12



5.- con agitación la cepa productora de oudenona en un medio consistente en 2,0% de glucosa y 0,5% de peptona (se colocó 125 cc. del medio en un frasco de 500 cc. de volumen) y se determinó la oudenona en la parte líquida y en la parte sólida, se encontraron las siguientes cantidades de oudenona en 10 cc del caldo de cultivo (la oudenona en la parte sólida se extrajo con metanol y se determino espectrofotométricamente):

10.-	Dias	mcg de oudenona en la parte líquida	mcg de oudenona en la parte sólida
	5	372	135
	7	845	365
	8	1300	410
15.-	11	2180	342

20.- Como aclara la presente invención, la oudenona es soluble en agua, metano, etanol, butanol, acetato de etilo, acetato de butilo, cloroformo y benceno, y se transfiere de la solución acuosa a los disolventes no mezclables en agua tales como butanol acetato de etilo, acetato de butilo, cloroformo y benceno. El coeficiente de partición determinado fué el siguiente: butanol-agua: 8 a pH 2,0, 7,5 a pH 3, 4 a pH 4, 2,5 a pH 5, 2,5 a pH 6, 3 a pH 8, 0,6 a pH 9, 0,6 a pH 10; agua-acetato de etilo: 5 a pH 2,0, 4 a pH 3, 1,5 a pH 4, 0,2 a pH 5, menos de 0,1 a pH 6, agua acetato de butilo: 3 a pH 2, 2,5 a pH 3, 1 a pH 4, 0,1 a pH 5, menos de 0,1 a pH 6; agua-cloroformo: 19 a pH 4, 1 a pH 5 y 0, 1 a pH 6. El coeficiente de partición entre metilisobutilquetona-

25.-

30.-



385461<sup>12</sup> N

agua se examinó probando la actividad para inhibir la hidroxilasa de tirosina y fueron los siguientes: 1 a pH 2, 1 a pH 3, 0,3 a pH 4, 0,1 a pH 5, 0,1 a pH 6.

- La oudenona se establece con pH 2,0, 7,0 y 9,0: no ocurre ninguna reducción de la actividad después de treinta minutos a 60°C y después de 5 minutos a 100°C. La oudenona en solución acuosa puede extraerse a un disolvente no mezclable en agua en ácido. La oudenona en la solución puede concentrarse por destilación para eliminar el disolvente. La oudenona es un disolvente orgánico no mezclable en agua puede transferirse a agua en reacción neutra o alcalina como se muestra por el coeficiente de --partición. Por ejemplo, puede extraerse la oudenona en el caldo fermentado con butanol, acetato de etilo, acetato de butilo, cloroformo, etc. a pH 2 - 3. Para esta extracción puede utilizarse un extractor de fase múltiple para proporcionar una extracción eficiente. Este proceso de la extracción puede aplicarse a todo el caldo incluyendo el micelio. La concentración del disolvente conteniendo oudenona por destilación o destilación bajo presión reducida proporciona un jarabe o polvo crudo seco a partir del cual puede cristalizarse la oudenona. La cristalización proporciona cristales blancos de oudenona. En este proceso, si es preciso, se filtra el caldo de cultivo y la oudenona en el filtrado se recupera por el proceso descrito arriba y la oudenona de la parte sólida se extrae con metanol, etanol, acetona, - acetato de etilo, acetato de butilo, cloroformo etc.
- 5.-
- 10.-
- 15.-
- 20.-
- 25.-
- 30.-

385461<sup>12</sup>



- Para cristalización de pequeñas cantidades de oudenona, el hexano o hexanobenceno son ejemplos de disolventes apropiados para la cristalización. No obstante, en caso de grandes cantidades, pueden emplearse
- 5.- la disolventes en los que la oudenona es más soluble por ejemplo, agua, metano, etanol, butanol, acetato de etilo, acetona, benceno y cloroformo. Para la -- cristalización, hay también el método de agregar un disolvente en el que la oudenona es insoluble a una
- 10.- disolución de oudenona.
- Si un material que tiene que cristalizarse contiene impurezas que impiden la cristalización, se transfiere la oudenona de un disolvente no mezclable en agua a la capa de agua en reacción neutra o alcalina y se extrae de la solución acuosa a un disolven
- 15.- te no mezclable en agua en ácido. Si es preciso, puede purificarse la oudenona por una cromatografía. -- Por ejemplo, la cromatografía de gel de sílice utilizando acetato de etilo-benceno (1:2) es un ejemplo -
- 20.- de métodos apropiados.
- Como aclara la presente invención, la oudenona tiene propiedades ácida y por consiguiente, puede emplearse un proceso de resina de intercambio de aniones para extracción o aislamiento de oudenona. -
- 25.- Por ejemplo, cuando se pasa 130 cc. de caldo fermentado conteniendo 310 mcg/cc de oudenona a través de una columna llenada con 20 cc de resina Dowex 1 X 2 (comercializada por Dow Chemical, U.S.A.) en forma -
- 30.-  $\text{Cl}^-$ , y después de lavar la columna con agua destilada, se eluyó la oudenona en la columna con 0,2N HCl.

385461<sup>12</sup>



5.- A continuación, aparecieron 16 mg. de oudenona en --  
fracciones nº 2-9 (después de pasar 0,2N HCl, el elui-  
do se cortó en 20 g cada uno). Una resina de inter-  
cambio de aniones 1RA-400 (comercializada por Rhom y  
Hass, U.S.A.) es también un ejemplo de resinas úti-  
les para extracción de la oudenona.

10.- Utilizando un proceso de resina de inter-  
cambio de aniones puede obtenerse la oudenona a par-  
tir del caldo fermentado con una producción de más -  
del 75%. Puede precipitarse la oudenona de su solu-  
ción según sus propiedades ácidas. Por ejemplo, puede  
precipitarse la oudenona de su solución acuosa agre-  
gando ión cúprico. El tratamiento del precipitado con  
ácido y la extracción con un disolvente orgánico se-  
guido por la evaporación proporciona oudenona en es-  
tado crudo o purificado.

15.-  
20.- Como se ha descrito arriba, según la pre-  
sente invención, puede recuperarse la oudenona por -  
procesos de extracción con disolvente, proceso de ab-  
sorción y elución, procesos de precipitación y proce-  
sos de destilación.

La oudenona que se obtiene por la presente  
invención tiene las siguientes propiedades y las si-  
guientes actividades biológicas:

25.- Los cristales de oudenona (placas blancas)  
obtenidas por recristalización de hexano o benceno-  
hexano funden a 77 - 79°C, tienen la fórmula de --  
 $C_{12}H_{16}O_3$  (análisis elemental: calculado: C 69.21, -  
H 7.74, O 23.05; se encuentra: C 69.5, H 7.86, O 23.01;  
30.-  $C_{12}H_{16}O_3$  por la espectroscopia de masa de gran reso-

385461



- lución), es soluble en agua, metanol, etanol, propanol, butanol, acetona, metil-isobutilquetona, acetato de etilo, acetato de butilo, benceno, cloroformo e insoluble en éter, petróleo y hexano, es ópticamente activa ( $(\alpha)_D^{20} = -10.6^\circ$ , 0,5% etanol). Su solución de tampón de fosfato (1/15M) (10 mcg/cc) con un pH 7,0 muestra un máximo a 246 m $\mu$  ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1000$ ) y su solución (10 mcg/cc) en 0. 1N HCl muestra dos máximos a 221 m $\mu$  ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 625$ ) y a 285 m $\mu$  ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 963$ ). Muestra las siguientes bandas en el espectro infrarrojo cuando se prepara en píldoras con bromuro de potasio: 3400, 2900, 1710, 1660, 1560, 1455, 1420, 1380, 1300, 1270, 1255, 1195, 1170, 1130, 1100, 1050, 1015, 990, 980, 955, 935, 895, 885, 860, 840, 820, 810, 780  $\text{cm}^{-1}$ .
- 5.- Tiene la propiedad ácida y se transfiere a un disolvente y no mezclable en agua en ácido y desde el disolvente a agua con un pH mayor de 5 - 6. Es absorbida por resina de intercambio de aniones y la titulación muestra pK' alrededor de 4,1. Da reacciones positivas a 2,4-dinitrofenilhidracina, cloruro ácido-férrico hidroxámico, tetrazolio, pero reacciones negativas a Fehling y Tollens. Absorbe dos moles de hidrógeno con carbono de paladio, proporcionando  $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_3$ .
- 10.- En cromatografía de capa fina en gel de sílice utilizando butanol-ácido acético agua (4 : 1 : 1) Rf es alrededor de 0,7 y utilizando benceno-acetato de etilo (2:1) Rf es alrededor de 0,1.
- 15.- La oudenona a 100 mcg/cc no muestra inhibición contra el crecimiento de las siguientes bacterias que crecen en un agar nutritivo: S. aureus, --
- 20.-
- 25.-
- 30.-

385461

12 NOV 1970



5.- E. coli (K12), S. typhosa, S. dysenteriae, K. pneumoniae, B. anthracis, B. subtilis, Mycobacterium-607, y ninguna inhibición contra Pyricularia oryzae, Candida Albicans, Saccharomyces cerevisiae, Penicillium chrysogenum creciendo en un agar nutriente de glucosa. Muestra inhibición contra Pyricularia oryzae a 12,5 mcg/cc, cuando este hongo crece en un medio de jugo de planta de arroz de pH 5,0.

10.- El compuesto que tiene la fórmula  $C_{12}H_{16}O_3$  y se funde a 75 - 80°C no era conocido y la oudenona es un compuesto nuevo. También se muestra por su estructura. Tiene baja toxicidad a los animales. -- Cuando se disuelve la oudenona en agua destilada (el pH era de 2,3) y se administra a ratones,  $LD_{50}$  fue de 138 mg/kg por inyección intravenosa, 163 mg/kg - por inyección intraperitoneal, 1000 mg/kg por inyección subcutánea y 1000 mg/kg por administración -- oral. Cuando se disolvió oudenona en agua destilada y neutralizada,  $LD_{50}$  fue de 1270 mg/kg por inyección intravenosa, 1310 mg/kg por inyección intraperitoneal, 1400 mg/kg por inyección subcutánea y 2200 -- mg/kg por administración oral. Cuando se administró oudenona oral o intraperitonealmente 160 mg/kg, 40 mg/kg ó 10 mg/kg diariamente durante 30 días, excepto la disminución de la presión sanguínea, no apareció ningún signo tóxico.

20.- Se probó el efecto de la oudenona en hidroxilasa de tirosina por el método siguiente: la mezcla de reacción contenía 0,1  $\mu$ mol de L-tirosina- $^{14}C$  -- (1,1 X  $10^5$  cpm), 1  $\mu$ mol de 2-amino-4- hidroxí-6,7-di

30.-

385461

12

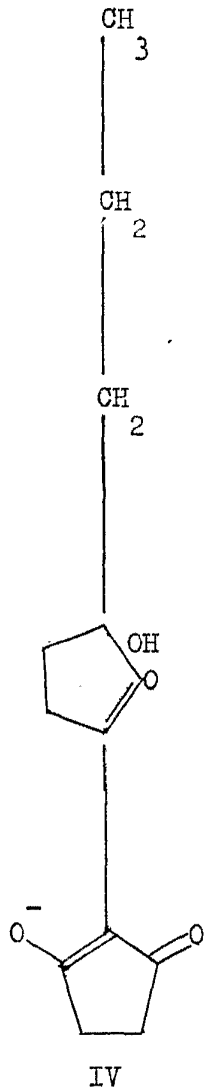


- 5.- metiltetrahydropteridina, 0,1 cc. de hidroxilasa de tirosina en solución (1 mg como proteína/cc), 200  $\mu$ mol de tampón de acetato de 6,0 de pH, 100  $\mu$ mol de mercaptoetanol, 100 mcg, 50 mcg, 25 mcg, 12,5 mcg ó 0 mcg de oudenona de 1,0 cc; después de 15 minutos a 30°C, se separó 3,4-dihidroxifenilalanina <sup>-14</sup>C -- por cromatografía de alúmina y se determinó por la radioactividad. En esta prueba, se observó la siguiente inhibición en % a las siguientes concentraciones de oudenona: 74,1% a 100 mcg/cc, 57,6% a 50 mcg/cc, 39,0% a 25 mcg/cc, 30,6% a 12,5 mcg/cc. Esta inhibición no cambió agregando Fe <sup>++</sup> a 1 X 10<sup>-3</sup>M.
- 10.-

- 15.- Cuando se trazaron los resultados según la ecuación lineweaver-Burk, la oudenona mostró una relación no competitiva con la tirosina y relación competitiva con 2-amino-4-hidroxi-6,7-dimetiltetrahydropteridina.

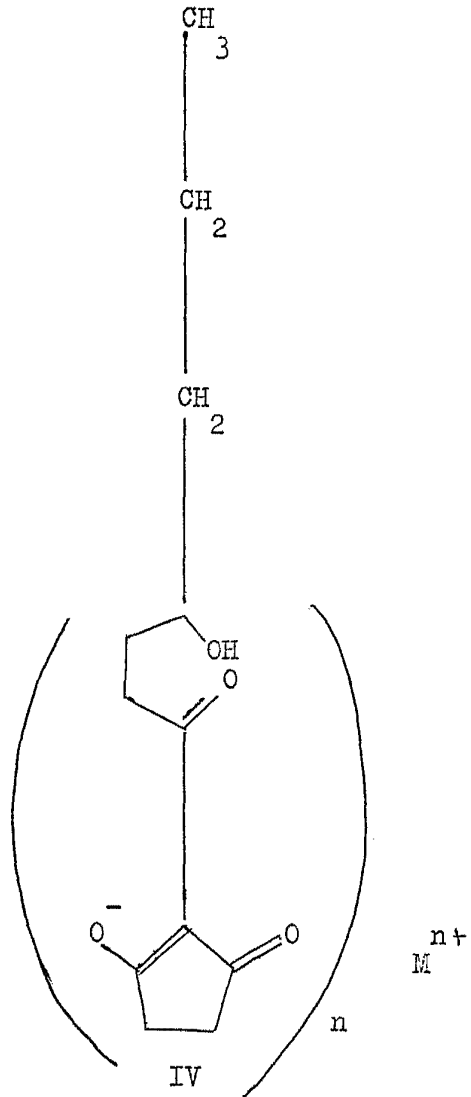
- 20.- Se determinó la estructura de la oudenona cristalizada a partir del hexano (I, que se muestra abajo). Como muestra la fórmula de la estructura, la oudenona no tiene grupo carboxilo, pero tiene propiedades ácidas como se ha descrito ya. Como se describe abajo, las sales de metal de la oudenona tienen la fórmula de (C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>)<sub>n</sub> M (M forma M<sup>n+</sup> ión).
- 25.- Es ahora cierto que la oudenona puede tener las siguientes estructuras (I, II, III, IV).

385461



to

$M^{n+}$



$M^{n+}$   
( $M^{2+}$  significa iones metálicos, Por ejemplo,  $Ca^{++}$   
es  $M^{2+}$  ).

Esta invención abarca todas las formas de  
oudenona que se han descrito arriba. Durante la --

385461

12 N



- 5.- biosíntesis de la oudenona, en el líquido de cultivo existe la oudenona especialmente como II, III y IV, y existe principalmente como I cuando se extrae en disolvente inorgánico no mezclable en agua. La presente invención abarca no solamente los procesos para la preparación de I a partir de II, III y IV, sino también los procesos para preparación de IV a partir de I, II, y III y los procesos para preparación de II y III de I y IV. Según la presente invención, se proporcionan ahora sales de oudenona con bases y los procesos para la preparación de las mismas. Según la presente invención, a partir de los compuestos, I, II, III, que se muestran arriba, pueden prepararse sales metálicas de oudenona.
- 10.-
- 15.- Según la presente invención, se agregan compuestos metálicos orgánicos o inorgánicos a una solución de oudenona, si es preciso se agrega agua, y se preparan las sales de oudenona (IV), quitando los disolventes o por cristalización. Por ejemplo,
- 20.- se agrega oudenona disuelta en acetato de etilo -- 2-etilhexoato de sodio y se cristaliza la oudenona de sodio que se precipita; a la oudenona que se convierte a II y III en agua, se agrega  $\text{KHCO}_3$  hasta -- un pH de 6,0, y la oudenona de potasio se cristaliza por evaporación de la solución con n-butanol --
- 25.- agregado para aplicar la evaporación; a la oudenona que se convierte a II y III en agua se agrega hidróxido de bario hasta un pH de 6,0, y la evaporación con n-butanol agregado proporciona oudenona --
- 30.- cristalina de bario. Como muestran los máximos en --

385461

12 NO



- la absorción ultravioleta de la oudenona en agua, -  
el tampón de fosfato 1/15M de pH 7,0 descrito arri-  
ba y como muestra la fórmula molecular de las sales  
descritas abajo, la oudenona reacciona con el agua  
5.- y forma el compuesto II y III. Asimismo, el compues-  
to II y III y sus formas racémicas pueden preparar-  
se con síntesis química. La presente invención abar-  
ca los procesos para preparar sales metálicas de --  
oudenona y sus formas racémicas a partir de II ó III  
10.- obtenidos por síntesis química.

Las sales de oudenona tienen las siguien-  
tes propiedades:

- Oudenona de sodio: Polvo cristalino blanco, m.p. --  
145 - 148°C; análisis calculado para  $C_{12}H_{17}O_4Na$ : C  
15.- 58.05, H 6,90, O 25.77, Na 9,26; encontrado: C 57.  
79, H. 7.32, O 24.96, Na 8.77.

- Oudenona de potasio: cristales blancos, m.p. 116 -  
117°C; análisis calculado. para  $C_{12}H_{17}O_4K$ : C 54.51,  
H 6.48, O 24.20, K 14.78; encontrado: C 55.73, --  
20.- H 6.77, O 23.6, K 13, 37.

- Oudenona de calcio: cristales blancos, m.p. 167 -  
169°C; análisis calculado. para  $(C_{12}H_{17}O_4)_2Ca$ : C -  
58.76, H 6.98, O 26.09, Ca 8.15; encontrado: C 58.  
40, H 7.15, Ca 8,19. Oudenona de magnesio: crista-  
25.- les blancos, m.p. 252 - 255°C; calculado para --  
 $(C_{12}H_{17}O_4)_2Mg$ : C 60.70, H 7.21, Mg 5.01; encontra-  
do: C 60.53, H 7.62, Mg 5.15.

- Oudenona de bario: cristales blancos, m.p.  
135 - 138°C; calculado para  $(C_{12}H_{17}O_4)_2Ba$ : C 49.03,  
30.- H 5.82, O 21.77, Ba 23.36; encontrado: C 49.24, --



385461<sup>2</sup>

- 5.- H 6.01, O 20.00, Ba 22.91. La oudenona de aluminio se obtiene como polvo blanco. La oudenona de sodio, potasio, calcio, o magnesio que da un pH de alrededor de 6 - 7 en agua puede utilizarse para administración oral e inyección.
- 10.- Como la invención presente expone las propiedades acídicas y estructuras de la oudenona en soluciones y los principios de procesos para la preparación de las sales de oudenona con bases, pueden hacerse fácilmente muchas modificaciones de los procesos descritos. La presente invención abarca aquellas sales que pueden hacerse con procesos modificados de los descritos aquí y los procesos de los mismos.
- 15.- La hidroxilación de la tirosina es el paso limitador de velocidad de la biosíntesis de la norepinefrina. Por consiguiente, la inhibición de la hidroxilasa de la tirosina da como resultado la inhibición de la síntesis de la norepinefrina in vivo lo que produce una disminución de la presión sanguínea. Si se reduce la síntesis de norepinefrina en las células del cerebro, muestra un efecto sedante. La inyección de una gran dosis de oudenona a ratones o ratas no provocó adormecimiento y no se reconoció el efecto sedante. Por consiguiente, se sugiere que la barrera sanguínea del cerebro inhibe la penetración de la oudenona en las células cerebrales. Como se ha descrito ya, la inyección diaria o la administración oral diaria de oudenona a ratas bajó la presión sanguínea. El efecto hipotensor pue
- 20.-
- 25.-
- 30.-



385461

12

- de verse más marcadamente, cuando se administra la oudenona a ratas genéticamente hipertensivas experimento desarrollado por el profesor Okamoto, Escuela de Medicina, Universidad de Kyoto. Cuando se inyectó 6,25 mg/kg intraperitonealmente a una rata con 183 mm de presión sanguínea y a otras ratas de 193 mm., disminuyó la presión sanguínea a 115 - 145 mm y 150 - 170 mm respectivamente durante 1 - 22 horas después de la inyección. Cuando se inyectó 3,13 --
- 5.- mg/kg a una rata de 173 mm, entonces se redujo la presión sanguínea hasta 140 - 148 mm. durante 1 - 22 horas después de la inyección. Cuando se administró intraperitonealmente 25 mg/kg a una rata de 190 mm. la presión se redujo a 140 - 163 mm. durante 1 - 22
- 10.- horas después de la inyección. La administración --
- 15.- oral de oudenona diariamente (3. 1 mg/kg, 6,25 mg/kg 12,5 mg/kg, 25 mg/kg) durante tres días mostró una reducción marcada de presión sanguínea. Provocó un 20 - 30% de reducción que continuó durante unos cinco días después de la última administración oral.
- 20.-

La oudenona inhibe la hidroxilasa de la tirosina y reduce la presión sanguínea. Por consiguiente, la combinación con otros agentes hipotensores - causa un efecto más fuerte. Especialmente, la combinación con la reserpina provoca el efecto más fuerte.

25.-

A continuación se describen ejemplos de - procesos para la producción y preparación de la oudenona y sus sales. Según la presente invención, se exponen las propiedades de la oudenona y un método

30.- de determinación espectrofotométrica y los procesos

385461

12



5.- para la producción y el preparado objeto todo ello del invento. Por consiguiente, es fácil encontrar un proceso por modificación de los métodos descritos en este invento. La presente invención abarca todos los procesos hechos con modificaciones del presente invento.

Ejemplo 1

10.- Se inculó la cepa 10F que habia sido -- cultivada en un medio de plano inclinado de agar -- formado por 2,0% de glucosa, 0,5% de levadura seca y 1,5% de agar a un medio de serrín en 4 frascos. - Se preparó el medio de serrín de la forma siguiente 15.- 10 g de serrín (de Magnolia hypoleuca,) se agregaron a 60 cc del medio formado por 2,0% de glucosa y 0,5% de levadura seca, se situó en un frasco de 500 cc de volumen y se esterilizó a 120°C durante 20 minutos. Se incubó durante 14 días a 27°C. Se agregó 20.- doscientos cincuenta cc. del medio formado por 2,0% de glucosa y 0,5% de levadura seca a cada frasco y se agitó, y la suspensión así preparada en los cuatro frascos se inculó a 150 litros del medio formado por 2,0% de glucosa, 0,5% de peptona, 0,3% de levadura seca, 0,3% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 25.- situándose en un fermentador de acero inoxidable de 400 litros de volumen y que habia sido esterilizado a 120°C durante 20 minutos. La fermentación continuó con agitación de 200 r.p.m. y aireación de 150 litros de aire estéril por minuto a 27°C. El pH -- 30.- fué de 5,68 a 0 horas, 5,1 a las 45 horas, 4,6 a las 55 horas, 4,35 a las 65 horas, 4,3 a las 83 ho-

385461

12



- ras, 4,7 a las 96 horas. Se disminuyó el azúcar reductor gradualmente y fue de 0,53% a las 96 horas. La cantidad de oudenona en el filtrado de cultivo --
- 5.- fué la siguiente: 19,5 mcg/cc a las 40 horas, 91 -- mcg/cc a las 65 horas, 94 mcg/cc a las 71 horas, -- 605 mcg/cc a las 80 horas. La fermentación se derivó a las 97 horas y se llevó el caldo de cultivo a un pH de 3,0 con ácido hidróclórico y se filtró, obteniéndose 110 litros del filtrado. Contenía 607 mcg/
- 10.- cc de oudenona. La pasta micelial húmeda era de 4,1 Kg y contenía 2,0 g de oudenona. Se agregaron 100 -- litros de n-butanol al filtrado de cultivo, mezclán dose y separándose, y a continuación se agregaron --
- 15.- 50 litros de n-butanol. Los extractos de butanol se combinaron (el volumen final fué de 166 litros), -- conteniendo 49,8 g de oudenona. El extracto de buta nol combinado se concentró hasta alcanzar forma de jarabe por destilación bajo presión reducida. El ja rabe se disolvió en 800 cc de mezcla de benceno-ace
- 20.- tato de etilo (2: 1 en volumen) y se pasó la solu-- ción a través de columna de gel de sílice (1,75 kg. de sílice se suspendió en el benceno-acetato de eti lo). El diámetro de la columna fué de 4 cm. El ben ceno-acetato de etilo (2:1) (6 litros) se pasó pos
- 25.- teriormente y se pasaron seis litros de benceno-ace tato de etilo (1:1). A continuación, se pasaron 30 `litros de benceno-acetato de etilo (1:2). Entonces, se obtuvo el eluido conteniendo 28,6 g (1100 mcg/cc) de oudenona. La concentración del eluido por desti-
- 30.- lación bajo presión reducida dió un jarabe pesando

385461<sup>12</sup>



40 g. Al jarabe se agregaron tres litros de hexano caliente y el enfriamiento proporcionó 17 g. de -- cristales de oudenona. La cristalización de oudenona a partir del líquido madre produjo otros 8 g. de oudenona.

5.-

La oudenona en el pastel de micelio se extrajo con 8 litros de metanol, y se concentró el extracto hasta 1,5 litros por destilación bajo presión reducida. Se ajustó a un pH de 3,0 con un ácido hidroc্লórico y se extrajo con 1,5 litros y 0,75 litros de n-butanol. Los extractos de butanol se combinaron y se concentraron hasta alcanzar forma de jarabe y se disolvió el jarabe en 100 cc de benceno-acetato de etilo (2:1) y se trató por medio de la cromatografía de gel de sílice utilizando 120 g. de gel de sílice en una columna. Esto produjo 1,0 g de oudenona por un procedimiento semejante al descrito arriba.

10.-

15.-

#### Ejemplo 2

20.-

La suspensión de micelio de la cepa productora de oudenona se preparó por el proceso descrito en el ejemplo 1, es decir, el cultivo de la cepa 10F en el medio de serrín. Se inocularon diez cc de la suspensión a 125 cc del medio que se colocó en un frasco de 500 cc de volumen y formado por 2,0% de glucosa, 0,5% de peptona, 0,3% de levadura seca, 0,3% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y se cultivó con agitación durante 11 días a 27°C. Así se obtuvieron 1000 cc del caldo de cultivo (310 mcg/cc.)

25.-

30.-

Se pasó todo a una columna de IRA-400 (comercializa

385461<sup>12</sup>



5.- da por Rhom y Hass, U.S.A.). Se pusieron 50 cc. de la resina en  $Cl^-$  en una columna de 2 cm de diámetro. Se pasó el agua destilada (100 cc) y a continuación 350 cc de 0, 1N HCl. El eluido contenía 350 cc de ou-  
denona. Al eluido se agregaron sucesivamente 350 cc y 100 cc de n-butanol y la concentración de los extractos de butanol por destilación bajo presión reducida produjo el jarabe. El jarabe se disolvió en benceno, y se agregó hexano para precipitar la oude-  
10.- nona. Así se obtuvieron 150 mg. de cristales de ou-  
denona.

Ejemplo 3

15.- Se cultivó la cepa 10F por el medio des-  
crito en el ejemplo 1. La fermentación se detuvo a las 96 horas. El filtrado de cultivo contenía 500 -  
mcg/cc de oudenona, y la pasta de micelio en 1,0 cc del caldo de cultivo contenía 80 mcg de oudenona. -  
Se llegó a 100 litros de este caldo de cultivo a un pH de 2,5 con HCl y se extrajo con 100 litros y 50  
20.- litros de n-butanol sucesivamente. Los extractos de butanol se combinaron (contenían 52 g. de oudenona) y se concentraron hasta conseguir un jarabe por des-  
tilación bajo presión reducida. Se extrajo la oude-  
25.- nona en el jarabe agregando 4 litros y 1 litro de acetato de etilo sucesivamente. Los extractos de --  
acetato de etilo se combinaron y se agregaron a 1,5 litros de agua. Bajo mezcla, se llevó a un pH de --  
7,0 con 10N NaOH y se separó la capa de agua. La ca-  
30.- pa de agua se llevó a un pH de 3,0 con HCl y se extrajo la oudenona con 3 litros y 1 litro de acetato

38546112



5.- de etilo sucesivamente. Estas capas de acetato de etilo se combinaron y se evaporaron hasta el jarabe. El jarabe se disolvió en 3 litros de hexano caliente y se enfrió. Produjo 18 g. de cristales de oudenona y otros 11 g. de cristales de oudenona se obtuvieron por concentración del licor madre.

Ejemplo 4

10.- Se agregó 0,02 M  $\text{CuSO}_4$  a 5,0 cc de 0,02M de solución de oudenona (4,17 mg/cc) gota a gota (la temperatura era de 17°C). A continuación se precipitó la sal cúprica azul de oudenona. El precipitado fué máximo cuando se agregó 2,45 - 3,0 cc de 0,02 M  $\text{CuSO}_4$ . El supernatante contenía 2,08 mg/cc de oudenona. Este precipitado se separó por filtración -  
15.- y se secó, produciendo 9,5 mg. de sal cúprica de oudenona.

Ejemplo 5

20.- Se disolvieron cristales de oudenona (m.p. 77,5 - 78,5°C) de 650 mg en acetato de etilo de 20 cc. Se agregaron cuatro cc de solución de 2-etilhexoato de sodio en metilisobutilquetona (45,2% v/v). Se agitó durante 65 minutos a la temperatura del ambiente. Se separó por filtración la oudenona de sodio - que se precipitó y se lavó con 5 cc de acetato de -  
25.- etilo secándose a continuación, produciendo 670 mg. de oudenona de sodio, punto de fusión 145 - 148°C. Su solución acuosa mostró un pH de 6,0 que era soluble en agua, metanol, etanol, pero insoluble en acetato de etilo, benceno y acetona.

30.- Ejemplo 6

385461<sup>2</sup> NO



- Se disolvieron cristales crudos de oudenona (1,18 g, punto de fusión 74 - 76°C) en 25 cc de acetato de etilo y se agregó 0,25 cc de agua destilada. A esta solución, se agregó 2,65 cc de solución
- 5.- de 2-etilhexoato de sodio en metilisobutilquetona - (45,2% v/v). Se agitó durante dos horas a la temperatura del ambiente, y se agitó después a 10°C durante una hora. La oudenona de sodio que se precipitó se separó y se lavó con 5 cc de acetato de etilo, -
- 10.- secándose, produciendo 1,35 g de cristales de oudenona de sodio.  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  a 246 m $\mu$  en la solución neutra fue de 853 y el  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  en la solución ácida a 285 m $\mu$  fue de 765.

Ejemplo 7

- 15.- Se obtuvieron 30 gramos de un jarabe por extracción de cerveza fermentada de una cepa productora de oudenona con n-butanol y la destilación bajo presión reducida y que contenía 12 g del compuesto activo como oudenona, se disolvió en 400 cc de -
- 20.- acetato de etilo y se agregó a esta solución 70 cc de solución de 2-etilhexoato de sodio en metilisobutilquetona (45,2% v/v). Después de agitar durante -
- 25.- 60 minutos a la temperatura del ambiente, se mantuvo durante toda la noche en cámara fría. La oudenona de sodio que se cristalizó se lavó con 40 cc de acetato de etilo y se secó, produciendo 10,7 g de -
- 30.- oudenona de sodio. El  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  a 246 m $\mu$  en la solución acuosa neutral fue de 842 y el  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  a 285 m $\mu$  en solución ácido fue de 760.
- Esta oudenona de sodio (IV, M<sup>n+</sup> es Na+) -

385461

12 NOV



- 5.- de agua destilada y se extrajo con 40 cc de acetato de butilo. Se agitó durante 10 minutos a un pH de 2,0 con 3N HCl, y se separó la capa de acetato de butilo. Se repitió el mismo procedimiento y se combinaron los extractos de acetato de butilo y se deshidrataron con sulfato de sodio. Se concentró hasta el jarabe bajo presión reducida. Del jarabe se cristalizó oudenona de 100 cc de ciclohexano. Se obtuvo un gramo de cristales de oudenona (punto de fusión 76 - 78° C).
- 10.-

Ejemplo 8

- 15.- Se disolvieron cristales de oudenona de 2,08 g en 50 cc de agua destilada, y se agregó 1,0 g de  $\text{KHCO}_3$ . A continuación se hizo el pH de 6,0. A esta solución, se agregaron 150 cc de n-butanol y se destiló la mezcla bajo presión reducida. A continuación, aparecieron cristales y se agregaron otros 100 cc de n-butanol y se continua la destilación. Se recogieron los cristales blancos que aparecieron por filtración y se lavaron con n-butanol y se secan, produciendo 2,39 g de cristales de oudenona de potasio, punto de fusión 116-117°C. El pH de la solución de 10 mg/cc fue de 6,95. El  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  en el 99% de metanol a 246 m $\mu$  fue de 592, el  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  a 246 m $\mu$  en la solución acuosa neutra fue de 788 y el  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  en la solución ácida a 285 m $\mu$  fué de 672.
- 20.-
- 25.-

Ejemplo 9

- 30.- Por un procedimiento semejante al descrito en el ejemplo 8, pero utilizando 185 mg. de hidróxido de calcio en vez de bicarbonato de potasio

385461<sup>12</sup>



se obtuvo 0,89 g de oudenona de calcio a partir de 1,04 g de oudenona.

Ejemplo 10

5.- Por un procedimiento semejante al descrito en el ejemplo 8, pero utilizando 787 mg de Ba  $(OH)_2 \cdot 8H_2O$  en vez del bicarbonato de potasio, se preparó 1,28 g de oudenona de bario a partir de 1,04 g de oudenona.

Ejemplo 11

10.- Por un procedimiento semejante al descrito en el ejemplo 8, pero utilizando 145 mg. de hidróxido de magnesio en vez de bicarbonato de potasio - se preparó 0,64 g de oudenona de magnesio a partir de 1,04 g de oudenona.

15.- Ejemplo 12

Por un procedimiento semejante al descrito en el ejemplo 8, pero utilizando 420 mg de bicarbonato de potasio en vez de bicarbonato de potasio, se preparó 1,2 g de oudenona de sodio a partir de - 1,04 g. de oudenona.

20.- La presente solicitud, que corresponde a las depositadas en Japon, con fecha 3 de febrero de 1.970 y 12 de Mayo de 1.970, bajo los números 8984/70 y 39772/70, respectivamente, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25.- NOTA

30.- Se declara como de Novedad y Propiedad -- para todo el territorio español, el contenido de -- las siguientes:



REIVINDICACIONES

- 5.- 1ª.- Procedimiento para la producción y preparación de un nuevo agente hipotensor, que incluye la cultivación de una cepa de una seta en una solución acuosa de hidrato de carbono conteniendo un nutriente nitrogenoso en condiciones seróbicas sumergidas hasta que se acumula una importante cantidad de oudenona en dicha solución y a continuación la recuperación de la oudenona de la citada solución.
- 10.- 2ª.- El procedimiento de la reivindicación 1ª en el que el organismo es uno que tiene propiedades comunes con la Oudemansilla.
- 15.- 3ª.- El procedimiento de la reivindicación 1ª en el que el compuesto hipotensor la oudenona, se recupera de una solución acuosa del mismo por la extracción con un disolvente no mezclable en agua en reacción ácida.
- 20.- 4ª.- El procedimiento de la reivindicación 1ª en el que el compuesto hipotensor, la oudenona, se recupera de un disolvente no mezclable en agua por extracción con una solución acuosa en reacción neutra o alcalina.
- 25.- 5ª.- El procedimiento de la reivindicación 1ª en la que se utiliza una resina de intercambio de aniones para la absorción de la oudenona.
- 30.- 6ª.- El procedimiento de la reivindicación 1ª en la que el compuesto hipotensor, la oudenona se recupera del sólido crudo o del jarabe disolviendo disolventes orgánicos en los que la oudenona es soluble.
- 
- A large, stylized signature or scribble in black ink, located at the bottom left of the page. It consists of several overlapping, sweeping lines that form a complex, abstract shape.

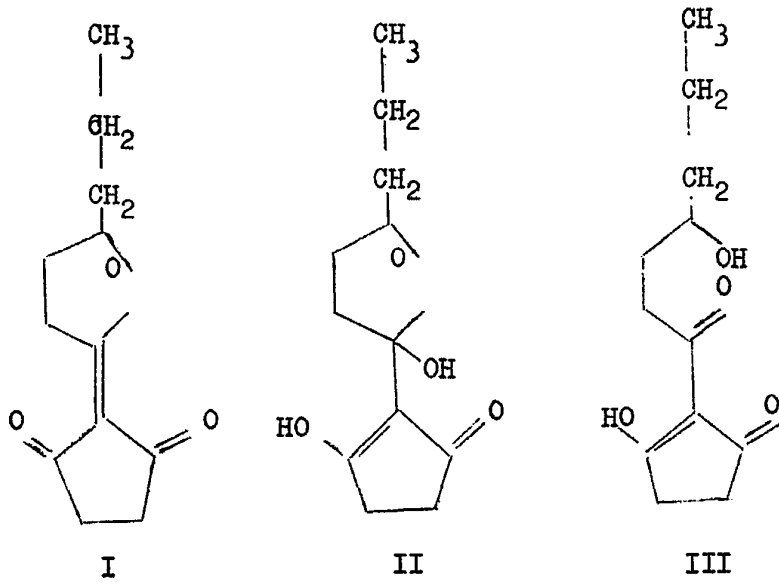


12

7a.- El procedimiento para preparación de sales metálicas de oudenona a partir de los compuestos I, II, III que se muestran a continuación agregando compuestos metálicos orgánicos o inorgánicos que fácilmente producen iones metálicos y aislamiento y cristalización de las sales metálicas de la oudenona.

10.-

15.-



20.-

25.-

8a.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION Y PREPARACION DE UN NUEVO AGENTE HIPOTENSOR"

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de TREINTA Y UNA hojas escritas a máquina por una sola de sus caras y dibujos que la ilustran.

Madrid, 12 de Noviembre de 1.970

**E. GONZALEZ VACAS**  
P. P.

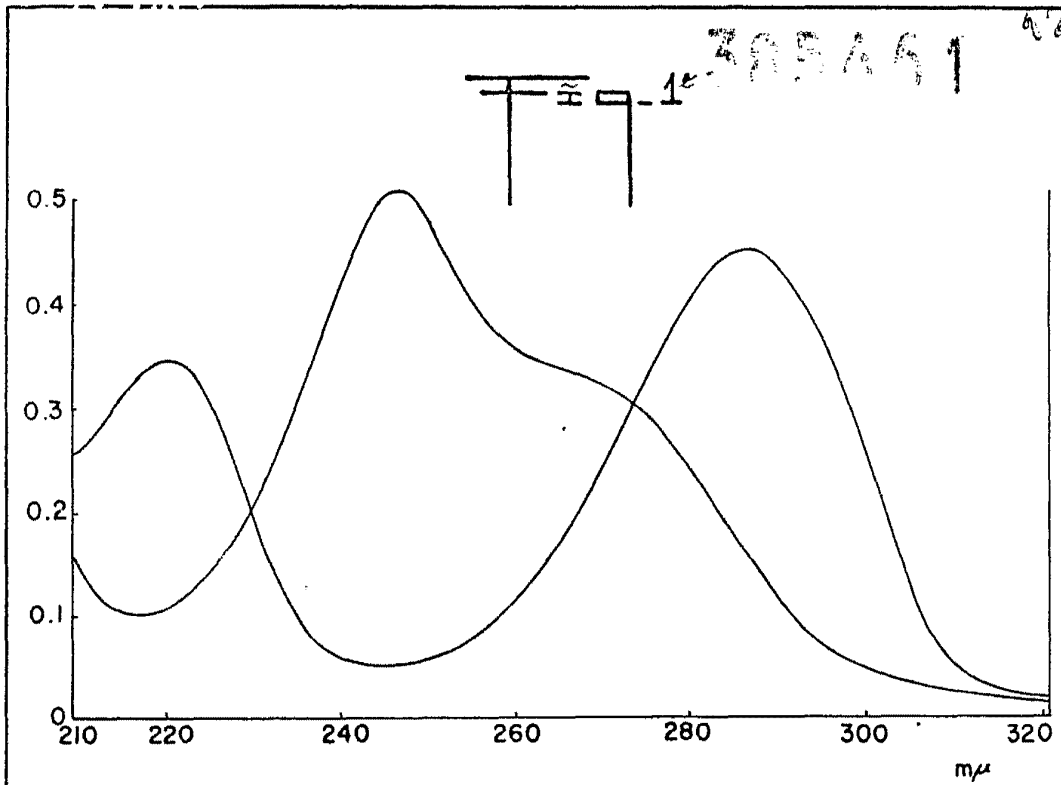
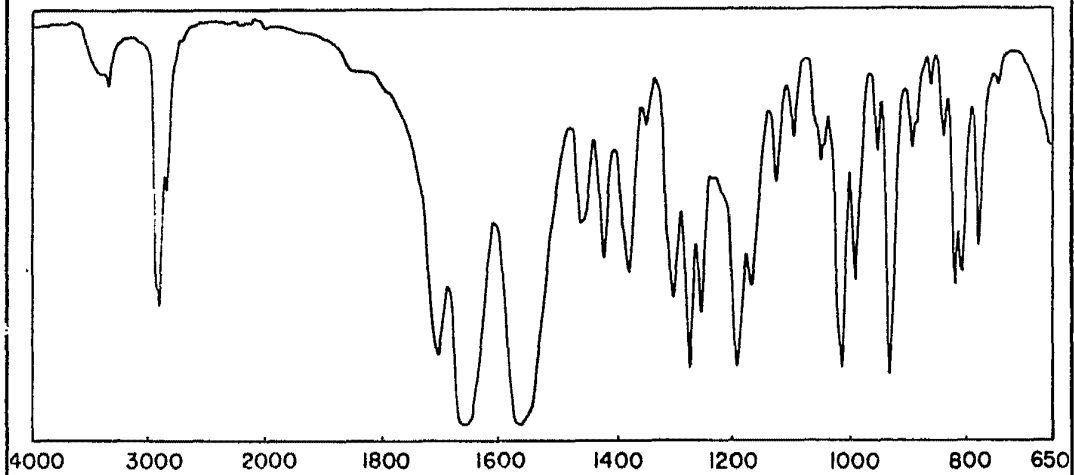


Fig-2<sup>e</sup>



Madrid a 12 de Noviembre de 1.970

E. GONZALEZ VACAS

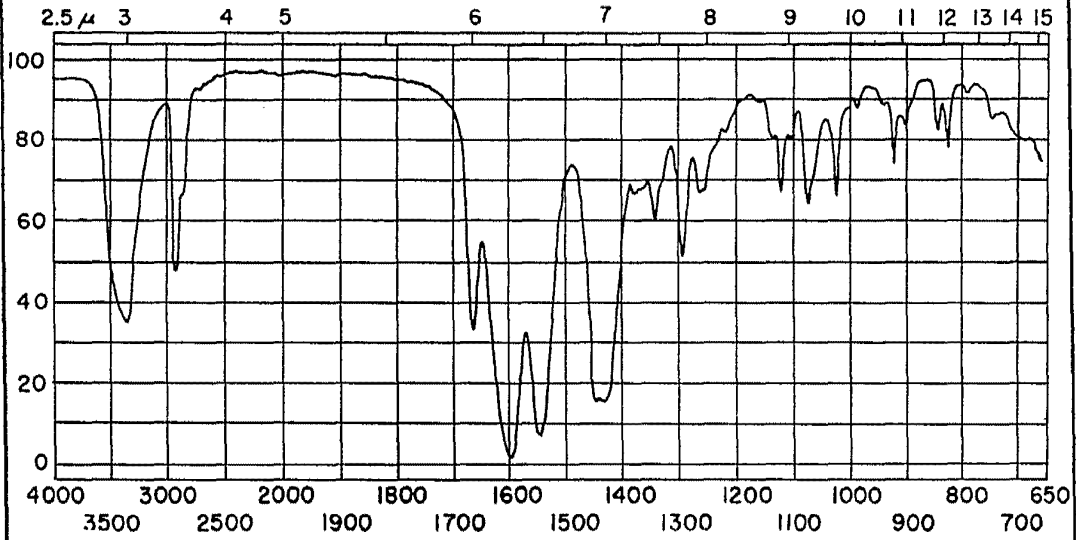
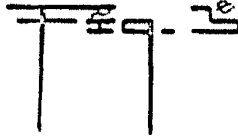
P. P.

Escala Variable



42

385461



Madrid a 12 de Noviembre de 1.970

E. GONZALEZ VASCO  
P. S.

Escala Variable