



PATENTE DE INVENCION

10	ES	11	45	10	A 1
		21	7722		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			12 ABR. 1977		

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
	31	NUMERO			
		80664/1976	7-7-1976		Japón

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C12D; A61K		

64	TITULO DE LA INVENCION
	Procedimiento para preparar polisacaruros conteniendo nitrógeno.

71	SOLICITANTE (S)
	KUREHA KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA (sociedad japonesa)

	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	TOKYO (JAPON) Nº8, Horidome-cho 1-chome, Nihonbashi, Chuo-ku

72	INVENTOR (ES)
	1.-Saburo UENO. 2.-Chikao YOSHIKUMI 3.-Fumio HIROSE 4.- Yoshio UHMURA 5.-Toshihiko WADA 6.-Takayoshi FUJII 7.-Eiichi TAKAHASHI. (todos de nacionalidad japonesa)

73	TITULAR (ES)
	KUREHA KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA (sociedad japonesa)

74	REPRESENTANTE
	D. Carlos Roeb Ungeheuer

1 El presente invento se relaciona con un procedimiento  
para la preparación de polisacaruros conteniendo nitrógeno  
teniendo una actividad anti-tumor y otras propiedades ex-  
celentes farmacodinámicas, de un hongo de la clase Basidio-  
5 mycetes perteneciente al género Coriolus.

Es conocido que puede producirse un polisacaruro, te-  
niendo efecto antitumor refinando el extracto del Basidio-  
mycetes con un disolvente acuoso.

10 Este método conocido, sin embargo, tiene el serio de-  
fecto de que la eficacia de extracción de los componentes  
activos es baja y, por tanto, es pobre la adaptabilidad  
práctica de este método a la producción industrial de las  
sustancias anti-tumor. Este método emplea la desalación por  
15 el uso de sulfato amónico, dialisis, precipitación por uso  
de un disolvente orgánico o filtración de gel, como medios  
de refinación de extracto, pero tales medios de refinación  
son extremadamente pobres en posibilidad de elaboración y,  
por tanto, tal método no es de un tipo ventajoso para eli-  
20 minar las sustancias de bajo peso molecular (con peso mo-  
lecular de menos de 5.000), contenidas en el extracto. Las  
sustancias de bajo peso molecular son casi nulas en la ac-  
tividad inhibitoria contra tumores sólidos de Sarcoma-180  
25 en ratones, en administración intra-peritoneal y además,  
tienen amargor y olor desagradable, de modo que la presen-  
cia de tales sustancias es indeseable en la utilización  
de los polisacaruros como medicamentos.

30 Los inventores han hallado, que un polisacaruro con-  
teniendo nitrógeno, teniendo un efecto anti-tumor y otros

1 varios efectos farmacodinámicos, puede obtenerse en un ele-  
vado rendimiento cuando un hongo, perteneciente al género  
Coriolus de Polyporaceae de la clase Basidiomycetes se es-  
trae con una solución acuosa, teniendo una concentración  
5 dentro de un alcance especificado y el extracto obtenido es  
refinado por medio de ultra-filtración y/o por osmosis in-  
versa.

El objeto primario de este invento, por tanto, es pro-  
curar un procedimiento para producir ventajosamente un po-  
10 lisacaruro conteniendo nitrógeno, teniendo excelente acti-  
vidad anti-tumor y otros varios efectos farmacodinámicos a  
partir de un hongo perteneciente al género Coriolus de los  
Basidiomycetes.

15 Los otros objetos de este invento resultarán evidentes  
al revisar la siguiente descripción detallada del invento.

El "hongo perteneciente al género de Coriolus" usado  
como material de partida en este invento, es una especie co-  
nocida de hongos pertenecientes a las Polyporaceae de la  
20 clase Basidiomycetes, y tales especies incluyen, por ejem-  
plo, Coriolus versicolor (Fr.) Quél., Coriolus hirsutus (Fr.)  
Quél., Coriolus consors (Berk.) Imaz., Coriolus conchifer  
(Schw.) Pat., Coriolus pubescens (Fr.) Quél., Coriolus par-  
gamenus (Fr.) Pat., y Coriolus biformis (Klotz.) Pat. (VEA-  
25 SE COLOURED ILLUSTRATIONS OF FUNGI OF JAPAN por Rokuya Ima-  
zeki and Tsuguo Hongo, Vol. I 1974, and Vol. II, 1975). Co-  
riolus versicolor (Fr.) Quél. (FERM-P No.2414), Coriolus  
consors (Berk.) Imaz. (FERM-P No.988), Coriolus hirsutus  
30 (Fr.) Quél. (FERM-P No.2711) y Coriolus pargamenus (Fr.)

1 Pat. (FERM-P No.2712), y estos hongos están depositados en  
el instituto de investigación de fermentación, agencia de  
ciencia y tecnología industrial (Chiba-shi, Japón), un or-  
ganismo del Gobierno designado por el Director General de  
5 la oficina de patentes del Japón. El término de "hongo per-  
teneciente al género *Coriolus*" usado en este invento se re-  
fiere al cuerpo de fruto y/o micelio del hongo y el más pre-  
ferido para el uso en este invento es el micelio obtenido  
del cultivo artificial de *Coriolus versicolor* (Fr.) Quéf.

10 El procedimiento según este invento se caracteriza  
por las etapas, de extraer el arriba mencionado hongo,  
usando solución alcalina acuosa de 0,01 N hasta 2N y some-  
tiendo el extracto obtenido a ultrafiltración y/o a osmó-  
15 sis inversa, para eliminar componentes de bajo peso mole-  
cular, con peso molecular de menos de 5.000 en el extrac-  
to.

20 La concentración de la solución alcalina, usada para  
la extracción del Basidiomycetes en este invento, se define  
dentro del alcance de 0,01 N hasta 2N por la razón de que,  
si tal concentración fuese menor de 0,01 N, el resultado  
no sería muy diferente de aquel obtenido por extracción  
con agua, mientras que si la concentración excediese de 2  
25 N, podría tener lugar descomposición. La extracción prefe-  
rida del Basidiomycetes puede realizarse satisfactoriamen-  
te usando una solución alcalina del alcance arriba mencio-  
nado de concentración a una temperatura de 50 a 100°C, pre-  
ferentemente de 80 a 98°C, durante un período de 20 a 600  
30 minutos. Deberá observarse que la temperatura de extracción

1 inferior a 50°C, dá por resultado insuficiente extracción  
del componente activo, mientras que la temperatura de ex-  
tracción excediendo de 100°C puede invitar a la reducción  
de actividad del componente activo obtenido, debido al ca-  
5 lor. El alcance preferido de tiempo de extracción varía, de-  
pendiendo de la concentración de temperatura de la solución  
alcalina usada, pero usualmente es preferible usar una tem-  
peratura dentro del alcance arriba definido, es decir, de  
10 20 a 600 minutos. Es posible obtener un resultado satisfac-  
torio por una operación de extracción, pero, si se desea,  
la operación de extracción puede ser repetida varias veces.

Pueden usarse varias clases de materiales alcalinos,  
tales como hidróxido sódico, hidróxido potásico, amoniaco  
15 o hidróxido cálcico, etc. para la solución alcalina en este  
invento se prefiere usar hidróxido sódico e hidróxido potá-  
sico.

El extracto líquido, obtenido de la manera arriba des-  
crita, se neutraliza de acuerdo con un método ordinario,  
20 usando un ácido mineral, tal como ácido clorhídrico diluido,  
y después sometido a ultrafiltración o a ósmosis inversa  
para eliminar las sustancias de bajo peso molecular (con  
peso molecular menor de 5.000) en el extracto. Ha sido prác-  
25 tica común refinar el extracto por medio de desalación por  
el uso de sulfato amónico, diálisis, precipitación por uso  
de un disolvente orgánico o filtración de gel, como se ha  
mencionado anteriormente, pero tales métodos de refinación  
fueron extremadamente pobres en manejabilidad y, por tanto,  
30 una solución a este problema ha sido un desideratum. Los

1 inventores han estudiado el significado de cada uno de los  
métodos citados de refinación conjuntamente con los efectos  
farmacodinámicos del producto refinado y han hallado que la  
solución a este problema residía en la eliminación de las  
5 sustancias de bajo peso molecular contenidas en el extrac-  
to. Y como resultado de ulterior estudio sobre un procedi-  
miento más racional y de más elevada manejabilidad para la  
eliminación de tales sustancias de bajo peso molecular, se  
ha conseguido establecer un procedimiento de la máxima efi  
10 cacia para eliminar las sustancias de bajo peso molecular,  
con peso molecular de menos de 5.000, adaptando las técni-  
cas de ultrafiltración y/o de osmósis inversa.

La característica prominente del medio de refinación,  
15 usado en este invento, es que las sustancias componentes  
son fraccionadas de acuerdo con el peso molecular usando  
una membrana, que puede ser denominada como una clase de  
tamices moleculares, bajo presión. En tal fraccionamiento  
por la membrana, los valores de los pesos moleculares se  
20 determinan usualmente de acuerdo con los tipos de membrana  
usada, pero como el rendimiento fraccionados depende gran  
demente del peso molecular y configuración de las moléculas  
en la solución, los valores de peso molecular fraccio-  
25 nado, indicados en el catálogo del fabricante de la mem-  
brana comercial y las condiciones ambientales generalmente  
aplicables no son siempre aplicables a la refinación del  
extracto de acuerdo con este invento.

A este respecto, se ha confirmado que una membrana  
30 llevando la indicación de 5.000 a 15.000 de pesos molecu-

1 lares fraccionados y teniendo de 98 a 100% de inhibición  
contra cytochrome e (peso molecular 13.000) como material  
patrón es recomendable para el uso en este invento. En cuan  
to a las condiciones operativas para el procedimiento refi-  
5 nador, de acuerdo con el presente invento, usando la arriba  
citada membrana, tales condiciones prácticamente fluctúan  
a través de cierta extensión dependiendo del tamaño y forma  
del aparato, paso de caudal del extractor y otros factores,  
pero en el caso de ultrafiltración, tal operación se rea-  
10 liza usualmente a presión de 0,5 a 5 kg./cm<sup>2</sup>, preferente-  
mente de 1 a 4 kg/cm<sup>2</sup>, y a una temperatura usualmente de 5  
a 70°C aunque la temperatura de operación puede variar, de-  
pendiendo de los tipos de membrana. En el caso de ósmosis  
15 inversa, la presión usada para la operación está usualmente  
dentro del alcance de 20 a 35 kg/cm<sup>2</sup>, con preferencia de  
20 a 25 kg/cm<sup>2</sup>, y la temperatura está usualmente dentro del  
alcance de 5 a 20°C.

20 Generalmente, se considera que la ultrafiltración es  
adecuada para fraccionamiento de material con peso molecu-  
lar superior a 10.000, mientras que la osmósis inversa es  
conveniente para fraccionamiento de material con peso mole-  
cular menor de 1.000. El valor de fraccionamiento de 5.000,  
25 que se propone alcanzar en este invento, es intermedio en-  
tre los alcances recomendados por los dos métodos respecti-  
vos arriba mencionados, pero se ha revelado que ambos mé-  
todos pueden ser aplicados al fraccionamiento de material  
con peso molecular de menos de 5.000, a través de selección  
30 adecuada de la membrana. Por tanto, al refinar el extracto

1 de acuerdo con el procedimiento de este invento, pueden  
usarse la ultrafiltración y osmósis inversa, bien sea de  
modo individual o en combinación, y tal selección se hace  
tomando en consideración la manejabilidad y eficacia ope-  
5 rativa. Las fracciones con peso molecular de menos de 5.000  
separadas del extracto líquido, son casi nulas en efecto  
inhibitorio contra tumores sólidos de Sarcoma-180 en rato-  
nes, en administración infra-peritoneal y también tienen  
amargor y olor desagradable, de modo que se considera que  
10 la presencia de tales sustancias de bajo peso molecular o  
de menos no es beneficiosa, sino más bién es perjudicial  
al efecto farmacodinámico del producto final de este inven-  
to, el polisacaruro conteniendo nitrógeno.

15 El extracto, desde el que se han separado las sustan-  
cias de bajo peso molecular (con peso molecular menor de  
5.000) por la operación refinadora arriba mencionada, se  
somete a secado de pulverización o secado de congelación  
y después se prepara en productos comerciales.

20 La sustancia obtenida de la manera arriba descrita, de  
acuerdo con este invento tiene un color castaño hígado y  
tiene un contenido de nitrógeno desde 2 a 8%, en muchos ca-  
sos de 3 a 6%.

25 La misma no muestra ningún punto de fusión distinto  
y se ennegrece gradualmente y se descompone a una tempera-  
tura superior a 120°C aproximadamente. En cuanto a la solu-  
bilidad de la sustancia de este invento, la misma es solu-  
ble en agua pero casi insoluble en alcohol, piridina, clo-  
30 roformo, benceno, y hexano.

1 También carece de sabor y es inodora.

Varios ensayos de reacción de color sobre la sustancia obtenida de acuerdo con el procedimiento de este invento dieron los resultados mostrados en la tabla I siguiente.

5

TABLA I (ensayos de reacción de color)

		<u>Color</u>		<u>Resultados</u>
	Reacción de ácido sulfúrico			
10	α-naftol (reacción de Molish)	Púrpura	Sacaruros	Confir <u>ma</u> do.
	Reacción de ácido sulfúrico indol (Reacción de Disch)	Castaño	Sacaruros	Confir <u>ma</u> do.
	Reacción de ácido sulfúrico			
15	Antrona	azul ver <u>doso</u> .	Sacaruros	Confir <u>ma</u> do.
	Reacción de ácido sulfúrico Fenol	Castaño	Sacaruros	Confir <u>ma</u> do.
	Reacción de ácido			
20	sulfúrico triptofano	Castaño Púrpura	Sacaruros	Confir <u>ma</u> do.
	Procedimiento de	Azúl	Enlaces de Peptiuro	Confir <u>ma</u> do.
	Lowry-Folin			
25	Reacción de Ninhidrina después de hidrolisis con ácido clorhídrico.	Azúl verdoso.	amino ácidos	Confir <u>ma</u> do.

Los resultados, mostrados en la tabla arriba citada, implican que la sustancia según el presente invento (a la que se hará referencia a continuación como "la presente

30

1 sustancia"), es un polisacaruro conteniendo nitrógeno. El  
peso molecular de la presente sustancia según se mide de  
acuerdo con el método ultra-centrífugo, alcanzó de 5.000 a  
300.000 y el peso molecular de promedio de peso alcanzó des  
5 de 10.000 a 100.000. Otros métodos de medición, tales como  
fraccionamiento por uso de una membrana de ultrafiltración,  
también dieron los valores de 10.000 a 100.000. Por tanto,  
puede estimarse con elevada confiabilidad, que el peso mo-  
lecular medio de la presente sustancia está dentro del al-  
10 cance de 10.000 a 100.000.

El polisacaruro, conteniendo nitrógeno, obtenido de  
acuerdo con el presente invento, no sólo demostró una ele-  
vada actividad anti-tumor, con elevada proporción de inhi-  
15 bición contra cáncer sólido de Sarcoma-180 en ratones en  
administración intra-peritoneal, sino que también demostró  
ser eficaz en administración oral. Esto es indicativo de  
una disponibilidad muy elevada del polisacaruro conteniendo  
nitrógeno de este invento como un agente anti-tumor oral y,  
20 realmente tal efecto ha sido confirmado en varios experimen-  
tos. El uso de la presente sustancia no se limita a tales  
medicaciones orales anti-tumor; también muestra una alta  
actividad de recuperación de inmunidad a través del hués-  
25 ped. Es decir, es eficaz no sólo para la prevención de accio-  
nes secundarias en quimioterapia de cáncer o incremento  
de sensibilidad en radioterapéutica, sino también para pre-  
vención de inmunidad y resistencia física del paciente des-  
pués de una operación o trasfusión de sangre y control o  
30 protección contra enfermedades infecciosas causadas por

1 virus o bacterias, debido a la declinación de la inmunidad  
o de la resistencia física. La administración oral de la  
presente sustancia también produjo un excelente efecto pa-  
ra mejorar la función del hígado, incrementar el apetito,  
5 ajuste de desórdenes intestinales y promoción de la micción  
También es eficaz para el tratamiento de la lepra.

Como se ha descrito arriba, es posible, de acuerdo con  
el presente invento, obtener un polisacaruro conteniendo  
10 nitrógeno, que demuestra una excelente actividad-anti-tumor,  
así como otros efectos farmacodinámicos, tales como los  
arriba mencionados, no solamente en administración intra-  
peritoneal, sino también en administración oral, con ope-  
ración relativamente simple y en alto rendimiento, según  
15 se ha mencionado en las siguientes ejecuciones.

Así, el presente invento puede realizar una ventajosa  
producción industrial de un agente anti-tumor del Basidio  
Mycetes.

20 El presente invento ahora se describirá en detalle por  
medio de algunas de sus ejecuciones.

EJEMPLO 1:

200 gr. de micelios secos de *Coriolus versicolor* (Fr.)  
Qué. (FERM-P nº 2414) (contenido de humedad: 8,8%; conte-  
25 nido de nitrógeno bruto: 2,5%) se añadió en 4 litros de  
solución al 0,1 N de NaOH y se extrajo con agitación en un  
baño de agua hirviendo a una temperatura interna de 90 a  
95°C durante una hora y después la mezcla se enfrió a una  
temperatura inferior a 50°C y gradualmente se añadió con  
30 solución de HCl al 1N para ajustar el pH a 7,0.

1 Entonces, los sólidos fueron separados por filtración de  
succión y estos sólidos fueron lavados con 500 cc de agua  
para obtener 4,2 litros de extracto líquido en total. Este  
extracto líquido entonces fué sometido a ultra-filtración  
5 utilizando un ultra-filtro de sobremesa por Amicon Inc.  
(membrana de ultra-filtración: PM-5), bajo agitación y re-  
frigeración y a presión operativa de  $1,5 \text{ kg/cm}^2$  a  $10^{\circ}\text{C}$  pa-  
ra eliminar sustancias de bajo peso molecular con peso mo-  
lecular de menos de 5.000, seguido de concentración para  
10 obtener 300 cc de solución elaborada. Esta solución fué ul-  
teriormente sometida a desecación de congelación para ob-  
tener alrededor de 26,6 gramos de polvo de color castaño  
hígado (rendimiento: 13,5%). Este polvo tuvo un contenido  
15 de humedad de 7,5% y su análisis elemental dió la siguien-  
te composición: C : 40,5%; H : 6,2%; N : 5,8%; O : 47,5%.  
(El tanto por ciento de oxígeno es el valor obtenido res-  
tando el tanto por ciento total de otros elementos desde  
100). Fué fácilmente soluble en agua. También, mostró una  
20 porporción de inhibición tal alta como 90% contra tumor só-  
lido de Sarcoma-180 en ratones, en administración intra-pe-  
ritoneal, y proporción de inhibición de 65% en la adminis-  
tración oral.

25 El efecto anti-tumor de los productos según este in-  
vento se determinó de acuerdo con un método ordinario, que  
más abajo se describiré brevemente.

Células de tumor de Sarcoma-180 fueron transplantadas  
en las cavidades abdominales de ratones y, después de dejar  
30 suficiente crecimiento de las células durante un período de

1 7 días, se transplantaron ulteriormente 106 de estas células bajo la piel de las axilas de otros ratones para formar tumores sólidos. La administración del producto a ensayar se inició después de la hora vigesimocuarta después del  
5 transplante. En el caso de administración intraperitoneal, el producto fué administrado a la dosis de 10 mg/kg por administración una vez cada segundo día durante 20 días por la dosificación total de 0,2 ml. por 20 gramos del peso del cuerpo del ratón y, en el caso de administración oral, el  
10 producto fué administrado a la dosis de 1000 mg/kg por administración una vez al día durante 20 días por la dosificación total de 0,2 ml. por 20 gramos del peso del cuerpo del ratón. Los tumores fueron enucleados el vigésimo quinto  
15 día después del transplante, y fué calculada la proporción de inhibición de crecimiento del tumor a partir del peso medio del tumor en los ratones, a los que se había suministrado el producto según este invento y el peso medio del tumor en los ratones de control. Para fines de comparación,  
20 la extracción y el tratamiento de refinación se ejecutaron bajo las mismas condiciones, pero usando agua en lugar de 4 litros de solución de 0,1N de NaOH. El rendimiento de producto fué de 7,8% o alrededor de 60% de aquel alcanzado con el procedimiento de este invento.

25

EJEMPLO 2

500 gr. de los micelios vivos de *Coriolus versicolor* (Fr.)  
Quél. (FERM-P nº 2414) (contenido de humedad: 70,8%; contenido bruto de nitrógeno: 2,6% calculado en base seca) se  
30 añadió con 2 litros de agua y se molió con un mezclador de

1 zumo durante 10 a 20 minutos y la mezcla entonces se añadió  
gradualmente con 500 cc de solución de NaOH al 1N y se ex-  
trajo en baño de agua caliente a temperaturas de 90 a 95°C  
durante 2 horas, seguido de neutralización con HCl, lavado  
5 y separación de células, de acuerdo con el procedimiento  
del Ejemplo 1, y el extracto obtenido fué sometido a ultra-  
filtración usando un ultra-filtro de sobremesa (membrana de  
ultra- filtración: G-05T membrana fabricada por Bio-Enginee  
ring Co.) para eliminar las sustancias de bajo peso mole-  
10 cular con peso molecular menor de 5.000, seguido de concen-  
tración y desecación de congelación para obtener 24,2 gr.  
de polvo de color castaño hígado (rendimiento: 15,1%). Este  
polvo tiene 7,6% de contenido de humedad y 6,0% de conte-  
15 nido de nitrógeno bruto y tiene una porción insoluble de  
aproximadamente 20% cuando se disolvió en agua. La porción  
restante fué bien soluble en agua. (El análisis elemental  
mostró C : 41,2%; H: 6,1%; N : 6,0%; O : 46,7%) ( el tan-  
to por ciento de oxígeno es el valor obtenido restando el  
20 total de los valores de C, H y N de 100). Este polvo fué  
disuelto y, después de separar los insolubles por un papel  
de filtro (nº 5c), se examinó su acción inhibitoria contra  
tumor sólido de Sarcoma-180 en ratones. Mostró una propor-  
25 ción de inhibición tan alta como 93% en el caso de adminis-  
tración intra-peritoneal y una proporción de inhibición de  
70% en el caso de administración oral.

### EJEMPLO 3

2 kg. de células secas de *Coriolus versicolor*(Fr.)  
30 Qué1. (FERM-P nº 2414) (contenido de humedad: 8,0%, conte-

1 nido de nitrógeno bruto : 2,5% ) se añadió con 20 litros de  
solución de NaOH al 0,4 N y se sometió a extracción durante  
2 horas bajo agitación en un recipiente de extracción equi-  
5 pado con camisa de calefacción-refrigeración y un agitador,  
mientras se ajustaba la temperatura de la camisa, de modo  
que la temperatura interna permaneciese en un alcance de 90  
a 95°C. La mezcla pastosa extraída fué refrigerada hasta  
temperatura ambiente y, después de ajustar el pH a 7,0 aña-  
10 diendo a porciones, bajo agitación, HCl al 2N, el residuo  
(sólidos) se separó del extracto líquido por un separador  
centrífugo. El residuo (sólidos) fué mezclado con 20 litros  
de solución al 0,4 N de NaOH y se sometió a un tratamiento  
similar de extracción a temperatura de 90 a 95°C durante 2  
15 horas, seguido de refrigeración, neutralización y separa-  
ción centrífuga (separación de células ) para obtener ex-  
tracto líquido y el residuo. Este último de nuevo se some-  
tió a un tratamiento de extracción similar con solución al  
0,4 N de NaOH durante 1 hora, para obtener un extracto. Es-  
20 ta operación de extracción, repetida tres veces, dió alre-  
dedor de 58 litros de extracto líquido en total. Este ex-  
tracto líquido fué concentrado aproximadamente a 10 litros  
por un concentrador de vacío y después se sometió a un ul-  
25 tra-filtro (usando la membrana HFA-180 por Abcor Inc.) a  
10°C y bajo una presión de 30 libras por pulgada cuadrada  
para eliminar las sustancias de bajo peso molecular ( con  
peso molecular de menos de 5.000 ) seguido de concentración  
adicional para obtener aproximadamente 5 litros de solu-  
30 ción elaborada. También, 70 litros de solución elaborada

1 conteniendo la fracción de bajo peso molecular descargada  
desde el ultra-filtro se sometió a osmósis inversa( usando  
la membrana AS205 por Abcor Inc.), para eliminar las sus-  
tancias de bajo peso molecular y después se concentró para  
5 obtener aproximadamente 5 litros de solución elaborada. Las  
condiciones operativas, usadas para este procedimiento fue-  
ron como sigue:

Presión media: 25 - 30 kg/cm<sup>2</sup>; temperatura de trata-  
10 miento : alrededor de 10°C. Después, las soluciones obte-  
nidas de la ultra-filtración y del tratamiento de osmósis  
inversa, fueron reunidas, y 10 litros de tal solución com-  
binada se pulverizarón por un secador de pulverización pa-  
ra obtener alrededor de 395 gr. de polvo color castaño hí-  
15 gado ( rendimiento : 19,9%). Este polvo tuvo un contenido  
de humedad de 7,0% y su análisis elemental dió los siguien-  
tes resultados: C : 40,8%; H: 6,0% ; N : 4,0% ; O : 49,2%.  
La proporción de inhibición de este producto contra tumor  
sólido de Sarcoma 180 en ratones fué de 92% en el caso de  
20 administración intraperitoneal y 70% en el caso de admi-  
nistración oral.

o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o

o-o-o-o-o

o

25

30

N O T A

El presente registro consta de las siguientes reivindicaciones:

1.- Procedimiento para preparar polisacaruros conteniendo nitrógeno, teniendo actividad anti-tumor, extrayendo un hongo de la clave Basidiomycetes con un disolvente acuoso, caracterizado por la mejora en que un hongo, perteneciente al género *Coriolus* de Polyporaceae, se extrae con una solución alcalina acuosa, teniendo una concentración dentro del alcance desde 0,01N hasta 2N y después el extracto obtenido es refinado por medio de ultra-filtración y/o por ósmosis inversa para eliminar las sustancias de bajo peso molecular, con peso molecular de menos de 5.000, en dicho extracto.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho hongo es un cuerpo de fruto artificial o natural y/o mycelio.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho hongo es *Coriolus versicolor* (Fr.) Quél.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha solución alcalina acuosa se aplica en una cantidad de 5 a 200 veces (de peso) del hongo.

5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha solución alcalina es una solución de hidróxido sódico.

6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha extracción se realiza a una temperatura

1 de 80 a 98°C.

7.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la eliminación de dichas sustancias de bajo peso molecular se realiza a presión.

5 8.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha ultra-filtración se realiza a presión de 0,5 a 5 kg/cm<sup>2</sup>.

10 9.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha ósmosis inversa se realiza a presión de 25 a 35 kg/cm<sup>2</sup>.

10.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos polisacaruros conteniendo nitrógeno, - contienen de 2 a 8% de peso de nitrógeno según se determina - por un análisis elemental.

15 11.- Procedimiento para preparar polisacaruros conteniendo nitrógeno.

Según se describe y reivindica en esta memoria descriptiva.

20 Consta de 17 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a

12 ABR. 1977

CARLOS ROEB  
P. P.

Fdo.: Pedro Matamoros

25

30