



ESPAÑA

10	ES	11	NUMERO	10	A1
		21	460885		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			20 JUL. 1977		

PATENTE DE INVENCION

20	PRIORIDADES:	22	FECHA	23	PAIS
	21	NUMERO	22-7-1976		Japon.
		51-87503			

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C12D / AGAK		

54	TITULO DE LA INVENCION
	Procedimiento para la obtención de polisacaruros.

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

	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	TOKIO. (JAPON) nº 8, Horidome-cho 1-chome, Nihonbashi, Chuo-ku.

72	INVENTOR (ES)
	1) Chikao YOSHIKUMI. / 4) Hiromitsu MAKITA. 7) Maruhisa HAYASHI. 2) Toshihiko WADA. 5) Kinzaburo SUZUKI. (los siete de naciona 3) Masahiko FUJII. 6) AKIO SHINMYO. lidad japonesa.

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
	D. Carlos Roeb Ungeheuer.

1 El presente invento se relaciona con un procedimiento
para la obtención de un polisacaruro, útil para la pre-
paración de medicamentos, particularmente de una medida
anticancerosa a partir del caldo cultivado obtenido del
5 cultivo sumergido de un hongo perteneciente a la especie
Coriolus de la clase de Basidiomycetes.

Es conocido, que un polisacaruro, teniendo una actividad
antitumoral, puede obtenerse del caldo, que se ha some-
tido un cultivo de hongos de la clase de Basidiomycetes
10 con un medio líquido acuoso. También es un hecho estable-
cido que, cuando un hongo de la clase de Basidiomycetes
se somete a cultivo sumergido con un medio líquido, se
produce el deseado polisacaruro no sólo en los micelios,
15 sino también en el medio.

Por lo tanto, para producir un polisacaruro a partir de
tal cultivo sumergido de un hongo de la clase Basidiomy-
cetes, se ha empleado generalmente un método, en que los
micelios se trituran mientras se mantiene el medio usado
20 (el caldo de cultivo) en la forma tal como está o después
de añadir a ello agua, después, el caldo de cultivo se
somete a filtración o a separación centrífuga, para se-
parar de ello el residuo micelial y el polisacaruro, que
se trataba de obtener, se recoge de la porción de licor,
25 así obtenida.

Aunque tal método ciertamente se aprecia como racional
y práctico, todavía comprende algunos problemas serios.
Por ejemplo, en el caso del producto de cultivo sumer-
30 gido, el mismo se divide inmediatamente en los micelios

1 y en el licor y tal división no puede realizarse eficaz-
mente debido, no sólo a la viscosidad elevada del sistema
sino también al alto contenido de agua de los micelios.
La adición de agua puede disminuir la viscosidad del cal-
do de cultivo e incrementar el régimen de extracción en
5 el agua, pero el uso de una cantidad excesiva de agua, da
por resultado un tiempo prolongado para la división y no
disminuye el contenido de agua de los micelios.
Por estas razones, han sido exigidas las mejoras en el
10 procedimiento para obtener un polisacaruro objetivo, del
cultivo sumergido, arriba mencionado, con más alta efi-
cacia y un mayor rendimiento desde el punto de vista in-
dustrial.
El principal objeto de este invento es procurar un pro-
15 cedimiento para obtener un polisacaruro teniendo activi-
dad anticancerosa y otras actividades preferentemente far-
macodinámicas a partir del cultivo sumergido de un hongo
de la clase de Basidiomycetes en una escala comercial y
20 en alto rendimiento.
Los otros objetos de este invento resultarán evidentes de
una consideración de la siguiente descripción detallada
del invento.
El procedimiento de este invento se caracteriza porque
25 un hongo perteneciente a la especie Coriolus de la clase
de Basidiomycetes primeramente se somete a cultivo sumer-
gido como un medio líquido acuoso y el caldo de cultivo
obtenido se seca a una temperatura de 60°C-150°C y se ex-
trae con un disolvente acuoso y después, la solución de
30

1 extracto, así obtenida se refina para separar de ella la
 sustancia con peso molecular menor de 5.000. La caracte-
 rística más sobresaliente en el procedimiento de este in-
 5 vento reside en la etapa, en que la sustancia objeto no
 se recoge directamente del caldo de cultivo, sino que se
 obtiene después de haber secado una vez el caldo de cul-
 tivo y extrayendo el mismo después con un disolvente acuoso.

10 Los hongos de la clase de Basidiomycetes, usados en el
 presente invento son unos que pertenecen al género de
 Coriolus y que incluyen, por ejemplo: Coriolus versico-
 lor (Fr.) Quel, Coriolus consors (Berk.) Imaz., Coriolus
 Hirsutus (Fr.) Quel, Coriolus pubescens (Fr.) Quel y Co-
 15 riolus conchifer (Schw) Pat. Las características morfo-
 lógicas y propiedades micológicas de estos basidiomycetes
 se explican en la obra " COLOURED ILLUSTRATION OF FUNGI
 OF JAPAN" por Rokuya Imadezi y Tsuguo Hongo, Vols. I,
 1974, y II 1975. Entre estos basidiomycetes, aquellos
 20 que se anumeran más abajo están depositados en el Insti-
 tuto de Investigación de Fermentación de la Agencia de
 Ciencia y Tecnología Industrial que es un órgano de de-
 pósito designado por el Director-General de la Oficina
 de Patentes del Japón:

	<u>Dep. No.</u>	<u>Dep.Date</u>
Coriolus versicolor (Fr.) Quel:	FERM-P-2414	Dec. 25/73
Coriolus consors (Berk.) Imaz :	FERM-P-988	Jun. 24/71

	<u>Dep. No.</u>	<u>Dep. Date</u>
1		
	Coriolus hirsutus (Fr.) Quel :	FERM-P-2711 Sept. 6/74
	Coriolus pargamenus (Fr.) Pat.:	FERM-P-2712 Sep. 6/73
5	De acuerdo con el presente invento, los hongos, tales como los arriba mencionados se cultivan por un método de cultivo sumergido. El término de "método de cultivo sumergido" aquí usado, significa un método, en que el cultivo se practica en un medio líquido bajo aireación y agitación y el crecimiento de los micelios no se efectúa en la superficie del medio líquido, sino en su mayor parte en la porción profunda de la capa de líquido. Tal cultivo se practica generalmente al régimen de aireación de alrededor de 0,1 hasta 2,0 l/l/minuto (medio) y a velocidad de agitación de alrededor de 30 hasta 800 r.p.m.	
10		
15	El medio usado para el cultivo sumergido puede ser de cualquier tipo conocido de medios naturales o sintéticos, usados generalmente en el cultivo de microorganismos, o modificaciones adecuadas de tales medios conocidos. Un cultivo de alrededor de 3-10 días con tal medio es suficiente para producir el polisacaruro del objetivo de esta patente en un rendimiento satisfactoriamente alto.	
20		
25	En el caso de cultivo sumergido, usando un medio acuoso, los micelios no se propagarán en la superficie del líquido para formar grandes masas, como en el caso de cultivo estacionario, sino que se forman en piezas relativamente pequeñas a modo de pastillas o piezas fibrosas, debido	
30		

1 a la fuerza de cizallamiento producida por agitación. Durante este procedimiento, el polisacaruro es producido, no sólo en el interior de los micelios, sino también al exterior de los mismos, es decir, también en el medio.

5 En el presente invento, el caldo cultivado, obtenido del arriba mencionado cultivo sumergido de un hongo del género de Basidiomycetes, se somete a desecación. Esta desecación se realiza usualmente a una temperatura dentro del alcance de 60 a 150°C. Los medios de desecación, usados para tal tratamiento de desecación, no se someten a ninguna restricción, sino que pueden ser de cualquier tipo empleado comunmente, tal como desecador de tambor, desecador de inundación o evaporador de capa fina.

10 Este tratamiento de secado del cultivo produce el efecto de facilitar grandemente la subsiguiente extracción con un disolvente acuoso, así como la recolección del polisacaruro por refinado de la solución de extracto. Debe observarse que, si la temperatura de este tratamiento secador es inferior a 60°C, resulta de ello, no sólo una velocidad reducida de desecación, sino también un alcance insatisfactorio de los efectos arriba mencionados. Deberá recordarse también que el polisacaruro objeto tiene la tendencia a hacerse susceptible a descomponerse cuando aumenta la temperatura secadora, de modo que se recomienda efectuar el tratamiento de desecación a una temperatura, que no exceda de 150°C.

25 El caldo de cultivo, que se ha sometido al tratamiento de desecación, tal como se ha mencionado arriba, entonces

30

1 se extrae con un disolvente acuoso con métodos usados co-
munmente en la extracción de los cuerpos de fruto o míce-
lio. El término de "disolvente acuoso", usado aquí, sig-
nifica agua o una solución acuosa conteniendo un álcali,
5 una sal (por ejemplo, cloruro sódico, acetato sódico), di-
solvente orgánico polar (por ejemplo, metanol, etanol)
o semejantes, pero en el presente invento tiene la máxi-
ma eficacia la extracción bajo calentamiento, con agua o
una solución alcalina diluida y la adaptación de las téc-
10 nicas de extracción múltiples, por el uso de tal solución
de extracto, resulta de la máxima ventaja para aplicacio-
nes industriales.

La solución de extracto, así obtenida, entonces se some-
te al tratamiento para refinar la solución separando de
15 ello las sustancias con peso molecular menor de 5.000,
obteniendo por ello un polisacaruro, según el objeto de
esta patente. Este tratamiento puede realizarse usando
cualquier método adecuado conocido, tal como la extracci-
20 ón por desalación, diálisis, ultrafiltración, ósmosis in-
versa, tratamiento con resina de intercambio de iones,
filtración o precipitación de gel con un disolvente or-
gánico. Estos métodos pueden usarse, bien sea de modo in-
dividual o en combinación.

25 De estos métodos, son los más eficaces para los propósi-
tos de este invento, la ultrafiltración y la ósmosis in-
versa.

30 Después de la separación del componente de bajo peso mo-
lecular (con peso molecular de menos de 5.000) de la so-

1 lución del extracto, por el arriba mencionado tratamiento de refinación, la solución del extracto se somete a desecación de pulverización o desecación de congelación y después se prepara en productos comerciales.

5 El polisacaruro, obtenido de acuerdo con el presente invento, de la manera arriba descrita) (haciéndose referencia posteriormente a tal polisacaruro, como a la sustancia presente "), es una sustancia de color castaño-higado con un contenido de nitrógeno de 2 a 8%, en la mayoría de los casos de 3 a 6% y tal sustancia no presenta ningún punto de fusión expreso y se ennegrece y descompone gradualmente a una temperatura superior a alrededor de 120°C. La sustancia presente es soluble en agua, pero casi insoluble en alcohol, piridina, cloroformo, benceno y hexano. También es casi insípida y también inodora. La Tabla 1 de más abajo muestra los resultados de varios ensayos de reacción de color, efectuados sobre la sustancia presente.

20 TABLA 1

Reacción de color	Color	Resultados
25 Reacción de α -naftol-ácido sulfúrico (reacción de Molish)	Púrpura	Sacaruros, confirmado
Reacción de indol-ácido-sulfúrico (reacción de Dirsch)	Castaño	Sacaruros, confirmado
Reacción de antrona-ácido sulfúrico.	Azul-verdoso	Sacaruros, confirmado
Reacción de fenol-ácido-sulfúrico	Castaño	Sacaruros, confirmado

1	Reacción de color	Color	Resultados
	Reacción de triptofano-ácido sulfúrico	Castaño purpúreo	Sacaruros, confirmados.
	Procedimiento de Lowry-Folin	Azul	Enlaces de peptiuro confirmado
5	Reacción de Ninhidrina después de hidrólisis con ácido clorhídrico	Azul purpúreo	α-amino ácidos, confirmado.
10	<p>Los resultados de los ensayos, dados en la tabla arriba citada, indican que la sustancia presente es un polisacacururo conteniendo nitrógeno. El peso molecular de la sustancia presente, según se mide por el método ultracentrífugo, estuvo dentro del alcance de 5.000 a 300.000 y el peso molecular medio fue de 10.000 a 100.000. Los valores obtenidos de otros métodos de medición, tal como el fraccionamiento con una membrana de ultrafiltración, estuvieron todos dentro del alcance de 10.000 a 100.000. Por lo tanto, fue una estimación altamente confiable poner el peso molecular medio de la presente sustancia dentro del alcance de 10.000 a 100.000.</p>		
15	<p>El polisacaruro, conteniendo nitrógeno, procurado de acuerdo con el presente invento, mostró una actividad antitumoral muy excelente en ratones, no sólo en administración intra-peritoneal, sino también en administración oral. Esto significa excelente disponibilidad de la sustancia presente como medicina oral anti-cancerosa. En efecto se ha determinado tal efecto por muchos y varios experimentos.</p>		
30			

1 Además, la sustancia presente, en adición al efecto oral
antitumoral, también exhibió una elevada actividad para
restaurar la inmunidad suprimida en el huésped. Es decir,
5 que la presente sustancia fue útil, no sólo para prevenir
los efectos secundarios desfavorables en la quimioterapia
del cáncer, y para incrementar la sensibilidad en
la radioterapia, sino también para prevenir una declina-
ción en la inmunidad o resistencia física del paciente,
10 resultante de una operación quirúrgica o transfusión de
sangre y para controlar o prevenir la infección de virus
o de bacterias, que resulta susceptible de ocurrir con la
declinación de la resistencia física o con la inmunidad
del paciente. La administración oral de la sustancia pre-
15 sente, también produjo un excelente efecto para mejorar
la función hepática, promoviendo el apetito, poniendo re-
medio a desórdenes intestinales y promoviendo la urina-
ción. También fue útil en el tratamiento de la lepra.
Ahora, el método de este invento se describe con ulterior
20 detalle, a título de ejemplo, de una de sus ejecuciones.
En la siguiente descripción de la ejecución, todos los
tantos por cientos (%) son de peso, a no ser que se indi-
que de otro modo.

Ejemplo:

25 1.600 litros de un medio compuesto de 10% de glucosa,
1,5% de extracto de levadura, 0,1% de KH_2PO_4 y 0,1% de
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ se alimentaron en un fermentador vertical de
2m³ y este medio fue inoculado con 20 litros de lodo de
30 hongos de *Coriolus versicolor* (Fr.) Qué1 FERM-P-2414,

1 obtenido de agitar el cultivo, seguido de cultivo durante
7 días a 26°C, régimen de aireación de 0,5 l/minuto por
litro de medio y régimen de agitación de 150 r.p.m.
5 El caldo de cultivo, así obtenido (lodo), fue dividido
en porciones de 500 litros y cada una de estas porciones
fue desecada por medio de un secador del tipo de doble
tambor. La temperatura de superficie del secador de tam-
bor fue ajustada de tal modo que la temperatura de super-
ficie del caldo cultivado (alcanzándose la superficie del
10 caldo en la forma de una capa fina sobre la superficie
del tambor) para que resultase de 65°C, 80°C, 90°C, 110°C
y 145°C, respectivamente y porque el contenido de agua
del producto secado fuera menos de 20% de peso (véase Ta-
15 bla 2).
Entonces cada uno de estos productos secados fue añadido
con 250 litros de agua caliente y se extrajeron a 95 +
1°C durante 3 horas y, después de enfriar, se separaron,
20 en el residuo micelial y en la solución de extracto, usan-
do un decantador del tipo de hélice y un separador centri-
fugo del tipo de placa separadora. La viscosidad aparente
del sistema de mezcla y el tiempo requerido para la sepa-
ración centrífuga en este procedimiento de extracción
25 fueron como se ilustra en la Tabla 2.
La solución de extracto, obtenida del tratamiento arriba
mencionado, fue pasada a través de una membrana PM-5 de
un ultrafiltro del tipo HF, fabricado por Amicon Co. para
librarse del componente de extracto con pesos moleculares
30 menores de 5.000, desde la solución de extracto, obtenien

1 do aproximadamente 100 litros de la solución refinada.
 Cuando la concentración de esta solución refinada fue de
 alrededor de 1%, la misma se concentró por medio de un
 5 concentrador a un nivel de concentración adecuado para
 el subsiguiente tratamiento de desecación de pulveriza-
 ción. Cuando la solución refinada se geliza-se haciendo
 difícil de ejecutar el tratamiento, y la solución se con-
 centrarse por encima de cierto grado, el valor límite de
 10 concentración, bajo el cual no tiene lugar ninguna gela-
 ción, se ilustra como concentración crítica en la Tabla
 2.

El tiempo requerido para la desecación de pulverización
 de la arriba mencionada solución concentrada y el rendi-
 miento del polisacaruro obtenido, también se ilustra en
 15 la Tabla 2.

A fines de comparación (ejemplos comparativos) el caldo
 cultivado, obtenido del mismo procedimiento, que se ha
 descrito arriba, fue tratado similarmente a la ejecución
 20 arriba descrita después de secar a 45°C y 160°C o' sin
 desecación y se hicieron mediciones similares sobre los
 respectivos productos con los resultados que se indican
 en la Tabla 2.

Tabla 2

Muestra No.	Ejemplos					Ejemplos compa- rativos.		
	1	2	3	4	5	1	2	3
Temperatura de secado °C	65	80	90	110	145	45	160	No drying.

1	Muestra No.	Ejemplos					Ejemplos Comparativos		
		1	2	3	4	5	1	2	3
5	Concentración crítica (% de peso) de solución refinada	15	15	15	15	15	8	15	4
10	Tiempo (horas) requerido para secado de pulverización.	10	10	10	10	10	24	10	37
15	Rendimiento (g)	900	900	900	900	900	950	800	950
	Actividades anti-tumorales (inhibidor de tumor (%)):								
15	Administración intraperitoneal:	96	97	95	98	97	93	60	95
20	Administración oral.	85	67	70	60	62	65	10	71
25	Observaciones						conteniendo impurezas.	conteniendo impurezas.	
30	<p>Se entiende ^{de} los valores numéricos dados en la Tabla 2, arriba citada, que, cuando el cultivo obtenido del procedimiento de este invento, se somete a un tratamiento de secado, bajo la condición de temperatura especificada, particularmente a una temperatura dentro del alcance de 60 a 150°C, el resultante tratamiento de extracción, el</p>								

1 tratamiento de refinación de extracto y la concentración de solución refinada y el tratamiento de desecación de pulverización, puede realizarse de un modo muy ventajoso y racional.

5 Cada uno de los productos de polisacaruro, así obtenidos fueron polvos de color castaño, fácilmente solubles en agua. (El producto del ejemplo comparativo 3 contuvo una cantidad de traza de insolubles). Los resultados del análisis elemental de los productos demostraron, que cada

10 producto estuvo compuesto de C, H, N y O, de los cuales N representó alrededor de 3 a 3,5%. También los resultados de los varios ensayos de reacción de color, ilustrados en la Tabla 1, indicaron la naturaleza positiva de los productos. Se confirmó de estos resultados, que los

15 productos, mencionados arriba, fueron un polisacaruro conteniendo nitrógeno.

Las actividades inhibitorias de las sustancias presentes contra tumores sólidos de Sarcoma-180 en ratones, tanto

20 después de administraciones intraperitoneales, como orales, se ilustran en la Tabla 2, indicando las excelentes actividades inhibitorias en todos los casos, excepto cuando el tratamiento secador se realizó a una temperatura alta excediendo de 150°C.

25 El efecto inhibitorio de tumor se midió de acuerdo con un método empleado ordinariamente, que se describe brevemente más abajo.

Las células de tumor de Sarcoma-180 fueron transplantadas intraperitonealmente a los ratones y después de su-

30

1
5
10
15
20
25
30

ficiente crecimiento de 7 días, 106 piezas de estas células fueron además transplantadas debajo de las pieles axilares de los otros ratones, para formar tumores sólidos. La administración de las muestras se inició 24 horas después del trasplante. En el caso de administración intraperitoneal, la sustancia fue dada a la dosis de 10 mg/kg una vez al día y cada segundo día durante el período de 20 días, para dar la cantidad total de 0,2 ml/20 gr. (peso del cuerpo del ratón) y, en el caso de administración oral, la sustancia fue dada a la dosis de 1.000 mg/kg una vez al día, continuamente durante el período de 20 días para dar la cantidad total de 0,2 ml/gr. (peso del cuerpo del ratón).
Cada tumor fue enucleado 25 días después del trasplante y el régimen de inhibición de tumor fue calculado del peso medio de los tumores en los grupos de ratones, a los que se había administrado la sustancia y el peso medio de tumores en el grupo de control.
La presente patente de invención recaerá sobre las siguientes reivindicaciones.

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

o-o-o-o-o

o

REIVINDICACIONES

- 1
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 1- Procedimiento para la obtención de polisacaruros, caracterizado porque un hongo, perteneciente al género *Coriobius* de la clase Basidiomycetes, se somete a cultivo sumergido en un medio líquido acuoso y el cultivo obtenido se seca a una temperatura de 60° a 150°C y se extrae con un disolvente acuoso y entonces la solución de extracto, así obtenida, se refina separando de ella las sustancias con peso molecular de menos de 5.000.
 - 2 - Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha extracción con un disolvente acuoso se realiza en etapas múltiples.
 - 3 - Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho disolvente acuoso es agua y/o solución alc-alina diluida.
 - 4 - Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha refinación de la solución de extracto se realiza por ultrafiltración y/o por ósmosis inversa.
 - 5 - Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho polisacaruro es polisacaruro conteniendo nitrógeno.
 - 6 - Procedimiento para la obtención de polisacaruros.

1

Según se describe y reivindica en la presente memoria des-
criptiva y consta de diecisiete hojas foliadas y escritas
a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a

20 JUL. 1977

5

CARLOS ROEB
P. P.

Doc. Alfonso Sánchez

10

15

20

25

30