

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial

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

ES

11

21

22

NUMERO

469.821

FECHA DE PRESENTACION

12-5-78

A1

AH



ESPAÑA

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
78641/77	30-6-77	JAPON
158959/77	29-12-77	JAPON
14674/78	10-2-78	JAPON

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

54 TITULO DE LA INVENCION UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN DERIVADO DE SESQUITERPENO.

71 SOLICITANTE (S) OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE No. 2-9, Kandatsukasa-cho, Chiyoda-ku, Tokyo - JAPON

72 INVENTOR (ES) Masanao Shinohara; Hirotsugu Kaise; Yoshimasa Nakano; Taketoshi Izawa; Yasuo Oshito y Wasei Miyazaki. todos ellos de nacionalidad japonesa.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1

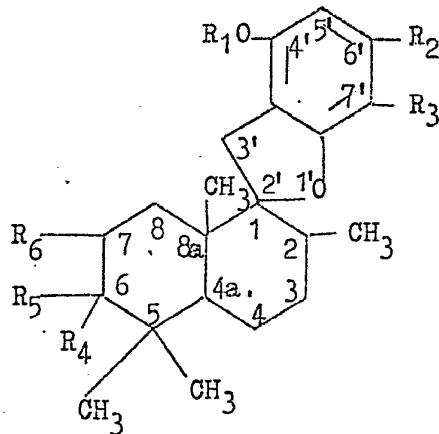
RESUMEN DE LA INVENCION

Un derivado de sesquiterpeno representado por la fórmula general (I):

5

10

(I)



15

20

25

donde R^1 representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo inferior o un grupo alcanóilo inferior: R^2 y R^3 , que pueden ser iguales o diferentes, representan cada uno de ellos un grupo formilo, un grupo hidroximetilo, un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo alcanoil(inferior) oximetilo o un grupo de fórmula $-CH=CR^7R^8$, donde R^7 y R^8 , que pueden ser iguales o diferentes, representan cada uno de ellos un átomo de hidrógeno, un grupo ciano, un grupo alcoxi(inferior)carbonilo o un grupo carboxilo o bien R^2 y R^3 pueden estar unidos para formar un anillo de lactona

1 de fórmula $\begin{array}{c} \text{-CH-O-C-} \\ | \quad \parallel \\ \text{R}^9 \quad \text{O} \end{array}$, donde R⁹ representa un átomo de hidró-
2 geno o un grupo hidroxilo; R⁴ y R⁶, que pueden ser iguales
3 o diferentes, representan cada uno de ellos un grupo hidro-
4 xilo o un grupo alcanoiloxi inferior; R⁵ representa un gru-
5 po hidroxilo; R⁴ y R⁵ pueden estar unidos para formar un -
6 grupo oxo (=O) y R⁴ y R⁶ pueden combinarse para formar un -
7 grupo alquilidendioxi inferior; sus sales farmacéuticamente
8 aceptables; procedimientos para la producción de los compues-
9 tos de fórmula general (I) y de sus sales; composiciones far-
10 macéuticas que contienen los compuestos de fórmula general(I)
11 y sus sales y métodos de uso de los compuestos de fórmula ge-
12 neral (I) y sus sales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 1. Campo de la invención

Esta invención se refiere a derivados de sesquiterpeno,
y a sus sales farmacéuticamente aceptables, que presentan ac-
tividad inhibidora contra el sistema complemento de animales
(actividad anticomplementaria y antitumoral) y son útiles co-
20 mo ingredientes activos en composiciones terapéuticas efica-
ces contra las enfermedades autoinmunes, nefritis, reumatismo,
enfermedades del colágeno, enfermedades alérgicas, cáncer, etc,
o como intermediarios para la producción de dichos ingredientes
activos.

25 2. Descripción de la técnica anterior

El término "complemento" se refiere a un grupo comple-

1 jo de proteínas de los humores corporales que, actuando junto
con los anticuerpos u otros factores, desempeñan un importan-
te papel como mediadores de las reacciones inmunológicas, alér-
gicas, inmuoquímicas y/o inmunopatológicas. Las reacciones
5 en las que participa un complemento tienen lugar en el suero
sanguíneo o en otros humores corporales y por lo tanto se con-
sideran reacciones humorales.

Se ha descubierto que el sistema de complemento está
asociado con inflamación, coagulación, fibrinólisis, reaccio-
nes de anticuerpo-antígenos y otros procesos metabólicos (US
10 Pat.4.021.544, Bull World Health Org. 39, 935-938 (1968),
Scientific American, 929(Nº5) 54-6(1973), Medical World News,
11 Octubre, 53-58, 64-66 (1974), Harvey Lectures, 66, 75-104
(1972), The New England Journal of Medicine 287, 489-495, 545-
15 549, 592-596, 642-646 (1972). The Johns Hopkins Med. J, 128,
57-74(1971), y Federation Proceedings, 32, 134-137(1973).

Se conocen diversos compuestos con actividad anticomple-
mentaria tales como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA),
Saldox, florizina (descrita en Borsos. J.Immunol. 94 (4), 629
20 (1964)), derivados de hidroxibenceno (como los descritos en
Shir-Mayer: Biochemistry N.Y. 7, 3003 (1968), guanidinas y fe-
noxiacetamidas (como las descritas en B.R. Baker: J.Med.Chem.
12, 408 (1968), ésteres fosfónicos (como los descritos en E.L.
Becker: B.B.A. 147, 289 (1967), clorofilina, glicirricina, etc.
25 Sin embargo, estos compuestos no son satisfactorios para fines

1 prácticos porque son muy tóxicos o presentan pequeña actividad anticomplementaria. Por lo que se sabe hasta ahora, no existe en el mercado ningún compuesto o agente anticomplementario.

COMPENDIO DE LA INVENCION

5 Por lo tanto, un objeto de esta invención es proporcionar nuevos derivados de sesquiterpeno así como sus sales, que presentan una gran actividad anticomplementaria y escasa toxicidad.

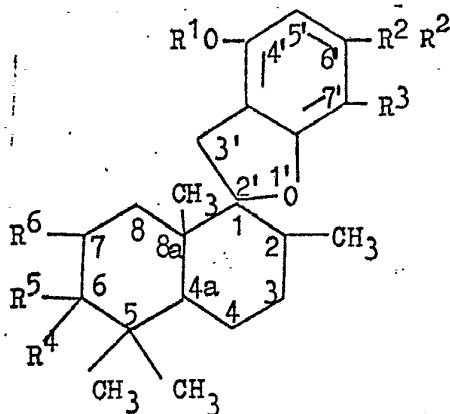
10 Otro objeto de esta invención es proporcionar un método de preparación de derivados de sesquiterpeno y sus sales, con una gran actividad anticomplementaria y escasa toxicidad.

Todavía otro objeto de esta invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que contienen dichos derivados de sesquiterpeno o sus sales.

15 Todavía otro objeto de esta invención es proporcionar un método de tratamiento de la nefritis, utilizando estos derivados de sesquiterpeno o sus sales.

Esta invención proporciona nuevos derivados de sesquiterpenos representados por la siguiente fórmula general (I):

20



25

(I)

1 donde R¹ representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo
inferior o un grupo alcanóilo inferior; R² y R³, que pueden
ser iguales o diferentes, representan cada uno de ellos un
grupo formilo, un grupo hidroximetilo, un grupo hidróxilo,
5 un grupo carboxilo, un grupo alcanoil(inferior)oximetilo o
un grupo de fórmula -CH=CR⁷R⁸, donde R⁷ y R⁸, que pueden ser
iguales o diferentes, representan cada uno de ellos un átomo
de hidrógeno, un grupo ciano, un grupo alcoxi(inferior)carbo
nilo o un grupo carboxilo o bien R² y R³ pueden estar unidos
10 entre sí para formar un anillo de lactona de fórmula $\begin{matrix} \text{-CH-O-C-} \\ | \quad \quad \quad || \\ \text{R}^9 \quad \quad \quad \text{O} \end{matrix}$,
donde R⁹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo;
R⁴ y R⁶, que pueden ser iguales o diferentes, representan
cada uno de ellos un grupo hidroxilo o un grupo alcanoiloxi
15 inferior; R⁵ representa un átomo de hidrógeno; R⁴ y R⁵ unidos
pueden formar un grupo oxo (=O) y R⁴ y R⁶ pueden combinarse para
formar un grupo alquilidendioxi inferior.

Esta invención también proporciona las sales de los derivados de sesquiterpeno de fórmula general (I) anterior, que se obtienen por reacción de estos derivados con compuestos básicos.

Esta invención también proporciona procedimientos para la producción de los derivados de sesquiterpeno de fórmula general (I) anterior, como se describe con detalle más adelante, utilizando como material de partida un compuesto

1 de fórmula general (Ia) descrito más adelante.

Esta invención también proporciona composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente efectiva de los derivados de sesquiterpeno de fórmula general (I), para conseguir actividad anticomplementaria en los animales y un método de uso, especialmente de tratamiento de los trastornos nefríticos en los animales, que consiste en administrar la composición farmacéutica al paciente que sufre dicho trastorno.

10

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1 y 2 son microfotografías de Stachybotrys complementi nov. esp. K-76 que es capaz de producir el compuesto de fórmula (Ia) de esta invención;

15

La Figura 3 es una microfotografía de Stachybotrys complementi nov. esp. T-789;

La Figura 4 es una microfotografía de Stachybotrys echinata var. T-791;

20

La Figura 5 es un espectro de resonancia magnética nuclear del compuesto de fórmula (Ia) obtenido en el Ejemplo 1 de esta invención;

Las Figuras 6 a 8 son espectros de resonancia magnética nuclear del compuesto (Ib) de esta invención obtenido en el Ejemplo 5, medido en tres disolventes diferentes y

25

La Figura 9 es un espectro de resonancia magnética nuclear del compuesto de esta invención obtenido en el

1 Ejemplo 9.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

I. COMPUESTOS

5 Los derivados de sesquiterpeno de fórmula general (I) de esta invención son descritos más específicamente a continuación. El grupo alquilo inferior representado por R^1 incluye grupos alquilo lineales o ramificados de 1 a 4 átomos de carbono, como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo y t-butilo.

10 El grupo alcanóilo inferior representado por R^1 incluye grupos alcanóilo lineales o ramificados, de 2 a 4 átomos de carbono, como acetilo, propionilo, butirilo e isobutirilo.

15 El grupo alcanoil(inferior)oximetilo representado por R^2 y R^3 incluye un grupo oximetilo sustituido con grupos alcanóilo inferior descritos anteriormente, como acetiloximetilo, propioniloximetilo, butiriloximetilo e isobutiriloximetilo. Los grupos alcoxycarbonilo inferior representados por R^7 y R^8 incluyen los grupos alcoxycarbonilo
20 lineales o ramificados de 2 a 5 átomos de carbono en total, como metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, n-propoxycarbonilo, n-butoxycarbonilo y t-butoxycarbonilo.

25 El grupo alcanoiloxi inferior representado por R^4 y R^6 incluye grupos alcanoiloxi lineales o ramificados de 2 a 4 átomos de carbono, como acetiloxi, propioniloxi,

1 butiriloxi e isobutiloxi.

El grupo alquilidendioxi inferior representado por R⁴ y R⁶ incluye los grupos alquilideno lineales o ramificados de 1 a 4 átomos de carbono, sustituidos con 2
5 átomos de oxígeno, como metilidendioxi, etilidendioxi, isopropilidendioxi y butilidendioxi.

Son ejemplos específicos de los derivados de sesquiterpeno de esta invención los citados a continuación. Sin embargo, esta invención no se considera limitada a estos
10 ejemplos específicos:

15 (1) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,-
6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-diformil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)

20 (2) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,-
6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(4',6',7'-trihidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)

(3) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,-
6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2,2-dicianovinil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)

25 (4) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,-
6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2-ciano-

1 2-etoxicarbonilvinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)

(5) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5-
6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di(2-ciano-
2-isopropoxicarbonilvinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzo-
5 furano)

(6) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,-
6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2-ciano-
2-carboxivinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)

10 (7) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5-
6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di(2-carbo-
xivinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)

(8) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5-
6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(7'-carboxi-6'-
hidroximetil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)

15 (9) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,-
7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2,2-dieto-
xicarbonilvinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)

(10) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2,2-
20 butoxicarbonilvinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)

(11) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-dihidroxi-
metil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)

25 (12) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-dihidro-

- 1 ximetil-4'-metoxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- (13) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(7'-carboxi-6'-
formil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- 5 (14) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6'-carboxi-7'-
formil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- (15) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(7'-carboxi-6'-
formil-4'-metoxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- 10 (16) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2,2-di
cianovinil)-4'-etoxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- (17) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2-
ciano-2-carboxivinil)-4'-propoxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- 15 (18) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(7'-carboxi-6'-(2,2-
dicianovinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- 20 (19) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(7'-carboxi-6'-
(2-ciano-2-carboxivinil)-4'-etoxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- (20) 6,7-dipropioniloxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,-
4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-difor-
mil-4'-propioniloxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- 25

- 1 (21) 6,7-diacetiloxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-(2,2-dicia-
novinil)-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- 5 (22) 6,7-dibutiriloxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2-ciano-2-etoxicarbonil-
vinil)-4'-butiriloxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- (23) 6,7-diacetiloxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2-ciano-
2-carboxivinil)-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- 10 (24) 6,7-diacetiloxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2,2-
dietoxicarbonilvinil)-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenco-
furano)
- 15 (25) 6,7-diacetiloxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-diacetil-
oximetil-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- (26) 7-acetiloxi-6-hidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,-
4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-diace-
tiloximetil-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- 20 (27) 6,7-diacetiloxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(7'-carboxi-6'-
formil-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- (28) 6,7-dipropioniloxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,-
4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(7'-carboxi-
25 6'-formil-4'-metoxi-2',3'-dihidrobenzofurano)

- 1 (29) 6,7-diacetiloxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2,2-
dicianovinil)-4'-etoksi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- 5 (30) 6,7-diisobutiriloxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,-
4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2-
ciano-2-carboxivinil)-4'-propoxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- (31) 6,7-diacetiloxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(7'-carboxi-6'-
10 (2,2-dicianovinil)-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- (32) 6,7-isopropilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,-
3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-
formil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- (33) 6,7-isopropilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,-
15 3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-
(2,2-dicianovinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- (34) 6,7-etilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2-ciano-
2-etoxicarbonilvinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- 20 (35) 6,7-isopropilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,-
3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-
di-(2-ciano-2-isopropoxicarbonilvinil)-4'-acetiloxi-2',3'-
dihidrobenzofurano)
- (36) 6,7-metilendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
25 5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2-cia-
no-2-carboxivinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)

1 (37) 6,7-isopropilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-
1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-
di-(2,2-dicianovinil)-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenczo-
furano)

5 (38) 6,7-propilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,-
4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-
(2-carboxivinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenczofurano)

10 (39) 6,7-isopropilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,-
3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-
(2,2-dietoxicarbonilvinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenczo-
furano)

(40) 6,7-isopropilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,-
4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-dihid-
roximetil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenczofurano)

15 (41) 6,7-isopropilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,-
4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-diace-
tiloximetil-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenczofurano)

20 (42) 6,7-isopropilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,-
4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-dihid-
roximetil-4'-metoxi-2',3'-dihidrobenczofurano)

(43) 6,7-isopropilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,-
4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(7'-carboxi-
6'-formil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenczofurano)

25 (44) 6,7-propilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,-
4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(7'-carboxi-6'-

- 1 formil-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- (45) 6,7-butilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,-
4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(7'-carboxi-6'-
formil-4'-metoxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- 5 (46) 6,7-isopropilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,-
3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-
(2,2-dicianovinil)-4'-etoxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- (47) 6,7-isopropilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,-
4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-
10 (2-ciano-2-carboxivinil)-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenco-
furano)
- (48) 6,7-isopropilidendioxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,-
4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(7'-carboxi-
6'-(2-ciano-2-carboxivinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenco-
15 zofurano)
- (49) 7-acetiloxi-6-oxo-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,-
4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-diace-
tiloximetil-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- (50) 7-acetiloxi-6-oxo-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,-
20 4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2,2-
dicianovinil)-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
- (51) 7-acetiloxi-6-oxo-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2-cia-
25 no-2-etoxicarbonilvinil)-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenco-
furano)

- 1 (52) 7-acetiloxi-6-oxo-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,-
4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-
(2-ciano-2-isopropoxycarbonilvinil)-4'-metoxi-2',3'-dihidro-
benzofurano)
- 5 (53) 7-propioniloxi-6-oxo-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,-
4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2,2-
butoxicarbonilvinil)-4'-propioniloxi-2',3'-dihidrobenczo-
furano)
- 10 (54) 7-acetiloxi-6-oxo-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,-
4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2-
ciano-2-carboxivinil)-4'-propoxi-2',3'-dihidrobenczofurano)
- 15 (55) 4-hidroxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahidro-furo{3,4-g}
benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-dihidroxi-2',5',5',8'a-te-
trametil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',8',8'a-decahidronafta-
leno)
- (56) 4,6-dihidroxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahidro-furo{3,4-g}
benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-dihidroxi-2',5',5',8'a-tetra-
metil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',8',8'a-decahidronaftaleno)
- 20 (57) 6-hidroxi-4-isopropoxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahidro-
furo{3,4-g}benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-dihidroxi-2',5',-
5',8'a-tetrametil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',8',8'a-decahi-
dronaftaleno)
- 25 (58) 4-propioniloxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahidro-furo{3,4-g}
benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-dipropioniloxi-2',5',5',8'a-
tetrametil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',8',8'a-decahidronafta-

1 leno)

(59) 4-acetiloxi-6-hidroxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahidro-
furo{3,4-g}benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-diacetiloxi-2',-
5',5',8'a-tetrametil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',8',8'a-deca-
5 hidronaftaleno)

(60) 4-butiriloxi-6-hidroxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahidro-
furo{3,4-g}benzofuran-2-espiro-1'-(7'-butiriloxi-6'-hidroxi-
2',5',5',8'a-tetrametil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',8',8'a-
decahidronaftaleno)

10 (61) 6-hidroxi-4-propoxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahidro-
furo{3,4-g}benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-propioniloxi-2',5',
5',8'a-tetrametil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',8',8'a-decahi-
dronaftaleno)

15 (62) 4-hidroxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahidro-furo{3,4-g}
benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-isopropilidendioxi-2',5',5',-
8'a-tetrametil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',8',8'a-decahidro-
naftaleno)

20 (63) 4,6-dihidroxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahidro-furo{3,4-g}
benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-isopropilidendioxi-2',5',5',-
8'a-tetrametil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',8',8'a-decahidro-
naftaleno)

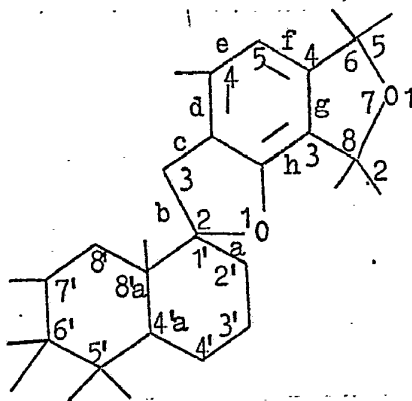
25 (64) 6-hidroxi-4-isopropoxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahidro-
furo{3,4-g}benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-propilidendioxi-
2',5',5',8'a-tetrametil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',8',8'a-
decahidronaftaleno)

1 (65) 6-hidroxi-4-acetiloxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahidro-
furo {3,4-g} benzofuran-2-espiro-1'-(6', 7'- isopropiliden
dioxi-2', 5', 5', 8'a-tetrametil-1', 2', 3', 4', 4'a, 5', 6',
7', 8', -8'a-decahidronaftaleno)

5 (66) 4-hidroxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahidro-furo {3,4-g}
benzofuran-2-espiro-1'-(7'-acetiloxi-6-oxo-2', 5', 5', 8'a-
tetrametil-1', 2', 3', 4', 4'a, 5', 6', 7', 8', 8'a-decahidro
naftaleno).

10 (67) 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a, 5,
6,7,8, 8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(7'-carboxilato-6'-
formil-4'-oxido-2'-3'-dihidrobenzofurano),

15 La nomenclatura de los compuestos anteriores se basa
en los números de posición indicados en la fórmula general (I)
anterior. Los compuestos de fórmula general (I) donde R^2 y R^3
forman un anillo de lactona junto con los dos átomos de carbono
a los que están enlazados, se nombran de acuerdo con los núme-
ros de posición indicados en la siguiente fórmula estructural
(I'):



1

II. PROCEDIMIENTOS

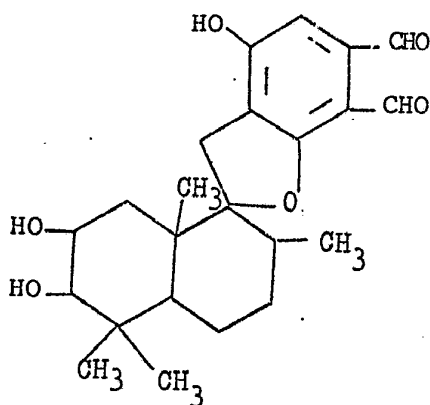
Los procedimientos para la preparación de los derivados de sesquiterpeno de esta invención de fórmula general (I) son descritos con detalle a continuación.

5

(a) Preparación de compuestos de fórmula general (Ia)

Los derivados de sesquiterpeno de fórmula general (I) de esta invención pueden prepararse por diversos métodos que dependen de los tipos de sustituyentes que contienen. Por ejemplo, un compuesto de fórmula general (I), donde
10 ambos grupos R^1 y R^5 son átomos de hidrógeno, ambos grupos R^2 y R^3 son grupos formilo y ambos grupos R^4 y R^6 son grupos hidroxilo, indicados por la fórmula general (Ia):

15



(Ia)

20

25

1 puede ser preparado utilizando los siguientes microorganismos conocidos pertenecientes al género Stachybotrys o microorganismos del género Stachybotrys aislados como resultado de esta invención.

5 Stachybotrys alternans IFO 9355

Stachybotrys chartarum IFO 5369

Stachybotrys chartarum IFO 7222

Stachybotrys cylindrospora 8858

Stachybotrys echinata 7525 y

10 Stachybotrys reniformis 7006.

Los microorganismos recientemente aislados son nuevas cepas pertenecientes al género Stachybotrys descrito más adelante y han sido denominados Stachybotrys complementi nov. esp. K-76, Stachybotrys complementi nov. esp. T-789 y Stachybotrys echinata var esp. 791.

15 (A). Lugar de Aparición.

(1). Stachybotrys esp. K-76.

Esta cepa fué aislada de una tierra de la ciudad de Ishigaki, Okinawa, Japón.

20 (2) Stachybotrys esp. T-789

Esta cepa fué aislada de la tierra en la ciudad de Naruto Tokushima, Japón.

(3) Stachybotrys esp. T-791.

25 Esta cepa fué aislada de la tierra en la ciudad de Tokushima, Tokushima, Japón.

1 (B) Características sobre diversos medios de cultivo

(1) Stachybotrys esp. K-76

Las características de cultivo de esta cepa en diversos medios de cultivo, basadas en observaciones visuales y microscópicas (Figuras 1 y 2) son las siguientes:

(a) Observación visual

Se observa muy buen crecimiento sobre diversos medios de cultivo habitualmente empleados en el cultivo de hongos y mohos, pero la adhesión de las fialoesporas no es necesariamente buena excepto en el medio agar-harina de avena. Las condiciones de crecimiento en medios típicos están indicadas a continuación.

(i) Medio de agar-extracto de malta

El crecimiento es relativamente lento y mediante cultivo a 27°C durante 30 días se forma una gran colonia de un tamaño de 30 a 35 mm. La colonia crece en forma circular y su perímetro presenta grandes entrantes. La superficie de la colonia es lisa y las hifas aéreas se extienden espesamente como una alfombra circular en el centro de la colonia y crecen densamente. Gradualmente la colonia cambia de color blanco en la primera fase de cultivo a marfil pálido (marfil pálido, 2 ca). Dos semanas después de iniciar el cultivo, comienzan a formarse ligeramente fialoesporas pero apenas son perceptibles a simple vista. No se forma esclerocio ni otros órganos esporógenos sexuales.

1 El color de la superficie posterior de la colonia oscila entre
incoloro y tostado cobrizo (tostado cobrizo, 5 ie). Se pro-
duce un pigmento soluble de color tostado cobrizo (tostado
cobrizo, 5 ie).

5 (ii) Medio de agar-patata-glucosa

El crecimiento es bueno y cultivando a 27°C durante
30 días, la colonia alcanza un tamaño de 45 a 47 mm. El cre-
cimiento de la colonia es convexo en el centro y la perife-
ria tiene entrantes. La colonia presenta un pliegue o círcu-
lo concéntrico a partir de su centro. Desde la etapa inicial
de cultivo, la colonia se cubre espesamente de hifas entre
blanco y rosa perlado (rosa perlado, 4 ca). A medida que pro-
gresa el cultivo, el color de la colonia se vuelve gris ne-
gruzco (gris, 1). Se forma un gran número de masas de espo-
ras con esterigma. Se observan grandes cantidades de gotitas
líquidas. El color del reverso oscila entre tostado orín (tos-
tado orín, 5 ie) a marrón rosáceo pálido (marrón rosáceo pá-
lido, 6 1/2 lg). El pigmento soluble producido presenta un
tono amarillo anaranjado oscuro (amarillo anaranjado, 3 ne)
pero es débil.

15 (iii) Medio de agar dox Czapeck

El crecimiento es bueno y cultivando a 27°C durante
30 días la colonia alcanza un tamaño de 40 a 45 mm. La colo-
nia presenta un pliegue concéntrico y una ondulación en el
centro. La periferia es ondulada. El color del reverso de la
25

1 colonia es tostado de cuero (tostado de cuero, 4 ne). En
la superficie de la colonia, unas hifas de incoloras a
blancas se adhieren formando una capa fina de forma con-
céntrica a partir de la parte central que no está cubier-
5 ta de hifas aéreas con un color de pan tostado (pan tos-
tado, 4 lg). No se observa ninguna gota de líquido pero
la parte central de la colonia está muy higroscópica. Ape-
nas se forman fialoesporas. El pigmento soluble es débil
y presenta un color dorado (dorado, 2 le).

10

(iv) Medio de agar harina de avena

El crecimiento es muy rápido y cultivando a 27°C
durante 30 días, la colonia alcanza un tamaño de 50 a 70 mm.
La colonia es delgada y plana y desde la fase inicial de cul-
tivo, se forman sobre toda la superficie hifas de incoloras
15 a blancas. Se forman hifas erectas de 3 a 4 mm de tamaño so-
lamente en la porción central de la colonia, pero no son den-
sas. Dos semanas después de iniciado el cultivo, la adhe-
sión de fialoesporas se extiende sobre toda la superficie de
la colonia y el color de la misma se vuelve pardo oliva pá-
lido (pardo oliva pálido, 1 li). El color de la superficie
20 posterior de la colonia es marrón beige (marrón beige, 3 ig)
a tostado (tostado 3 ie). El pigmento soluble producido es
de un débil color amarillo colonial (amarillo colonial,
25 2 ca).

1 (2) Stachybotrys esp. T-789

Las características de cultivo de la cepa T-789, que es un hongo-imperfecto, sobre diversos medios de cultivo fueron observadas visual y microscópicamente (como muestra la Figura 3) y los resultados están descritos a continuación. Las características morfológicas de la cepa T-789 por observación microscópica concuerdan bien con las de Stachybotrys esp. K-76. Sin embargo, existen diferencias en las propiedades en los medios de cultivo. La diferencia de características es máxima en los dos medios de cultivo siguientes.

10 (a) Observación visual

(i) Medio de agar extracto de malta

El crecimiento es muy lento y cultivando a 27°C durante 30 días la colonia alcanza un tamaño de 17 a 20 mm. La periferia de la colonia tiene aspecto ondulado y es restrictiva. La colonia presenta una forma ondulada en el centro y un pliegue radial en su periferia. Hifas aéreas se adhieren esparcidamente a toda la superficie de la colonia. En la fase de cultivo inicial, las hifas son blancas y se forman conidias gradualmente. La parte central de la colonia adquiere un color topo (topo, 1) y las conidias crecen lentamente. Hacia la periferia de la colonia la formación de conidias es anular. El color del reverso es tostado corcho (tostado corcho, 4 ie). El pigmento soluble es abundante y de color

1 ambarino (ambar, 3 le).

(ii) Medio de agar dox Czapek

5 El crecimiento es bueno y cultivando a 27°C durante 30 días el tamaño de la colonia llega a 45 mm. El centro de la colonia es convexo y la colonia forma un pliegue radial. La periferia de la colonia presenta un crecimiento ondulado. Hifas aéreas blancas se adhieren esparcidamente en forma concéntrica circular hacia afuera desde la parte convexa central de la colonia. Se forman conidias concéntricamente solamente en la periferia de la colonia. Las hifas están en estado disuelto en la porción convexa y muy higroscópicas. El color del reverso de la colonia es marrón mostaza (marrón mostaza, 2 pi). No se forman pigmento soluble.

10 (3) Stachybotrys esp. T-791

15 Las características de cultivo de la cepa T-791, que es hongo imperfecto, sobre diversos medios de cultivo, basándose en observaciones visuales y microscópicas (mostradas en la Figura 4) son las siguientes:

(a) Observación visual

20 (i) Medio de agar extracto de malta

25 El crecimiento es rápido e irregular. El color del reverso de la colonia es tostado (tostado, 3 ie) a marrón oscuro (marrón oscuro, 2 pn). La colonia es plana y la formación de conidias es buena. El color de las hifas es bizcocho (bizcocho, 2 ec) a tostado (tostado, 3 ie) y se observan

1 gotitas de líquido que exudan. No se produce pigmento soluble.

(ii) Medio de patata-glucosa

5 El crecimiento es muy rápido y cultivando a 17°C durante 30 días, la colonia alcanza un tamaño de 70 mm. La periferia de la colonia se extiende dendríticamente y se observan hifas blancas diluidas adheridas. Las gotitas de líquido son notables. Apenas se observa formación de esporas. El color del reverso de la colonia es ambar pálido (ambar pálido, 3 ie). No se forma pigmento soluble.

10 (iii) Medio de agar Czapek

El crecimiento es malo.

(iv) Medio de agar moco sintético

El crecimiento es malo.

15 (v) Medio de agar harina de avena

El crecimiento es muy bueno de manera que en dos semanas la placa Petri está cubierta. La colonia es delgada y plana. La formación de hifas es abundante desde la fase inicial de cultivo y la formación de conidias también es rápida. El color de la colonia cambia de blanco a marrón oscuro (marrón oscuro, 3 pn) a medida que progresa el cultivo. Aparecen grandes cantidades de gotitas líquidas en las hifas. No se forma pigmento soluble.

20 (C) Propiedades fisiológicas

25 Los microorganismos Stachybotrys K-76, T-789 y T-791

1 son todos ellos cepas aerobias y presentan las siguientes propiedades fisiológicas.

(1) Stachybotrys esp. K-76.

	<u>pH</u>	<u>Temperatura</u>
5 Condiciones de crecimiento:	3,5-11,5	15-35°C
Condiciones de crecimiento óptimo	6,0-9,5	20-32°C

(2) Stachybotrys esp. T-789

	<u>pH</u>	<u>Temperatura</u>
10 Condiciones de crecimiento:	3,5-11,5	15-38°C
Condiciones de crecimiento óptimo	4,5-10,5	20-32°C

(3) Stachybotrys esp. T-791

	<u>pH</u>	<u>Temperatura</u>
15 Condiciones de crecimiento:	3,5-11,5	15-38°C
Condiciones de crecimiento óptimo	4,5-9,5	20-30°C

(D) Propiedades morfológicas

(1) Stachybotrys esp. K-76

20 Lo siguiente se observa claramente en las Figuras 1 y 2. No se observa esclerocio ni otros órganos reproductores sexuales en diversos medios de cultivo pero se observa la formación de esporas asexuales del tipo de fialo-esporas.

25 Se forman hifas sobre diversos medios de cultivo, ramificadas complicadamente y extendidas longitudinal y

1 transversalmente con una anchura de las hifas de 2 a 4 micras.

Los esterigmas simplemente se ramifican a partir de las hifas (no hay ramificación de un esterigma a otro) y contienen de 3 a 4 septos a partir del pie de las células en la parte de la base. Después los esterigmas se extienden erectos o suavemente curvados. La anchura de las hifas del esterigma es de 4,3 a 4,7 micras en la base y de 3,6 a 4,5 micras en la parte central. Las puntas del esterigma son ligeramente convadas y desde los extremos del fialoforo se forman de 3 a 7 fialuros erectos de forma entre elíptica y ovalada, con un tamaño de 7,9-9,3 x 3,6-4,7 micras. Los fialuros son lisos y con un color que oscila entre incoloro y marrón amarillento pálido. Se forman fialoesporas conectadas basipétalmente a partir de los extremos del fialuro. El fialoforo no forma cadenas rectas sino que se convierte en pequeñas masas semicirculares viscosas, cuyo número es de 7 a 26. Los fialoforos son de forma subglóbosa a oval con un tamaño de 4,9-8,0 x 3,3-4,7 micras y las superficies del fialoforos son entre ásperas y verrugosas y su color es hiedra oscuro (hiedra oscuro 24 po) a negro grisáceo. No se observa ninguna membrana debida a materia mucosa sobre las masas de fialoesporas.

El estado taxonómico de esta cepa con las propiedades microbiológicas citadas ha sido investigado en la obra
25 The Genera of Hyphomycetes From Soil, The Williams & Wilkins

1 Company, Baltimore, (1968); G.L. Barron y J.C. Gilman, A
Manual of Soil Fungi, The Iowa State University Press, Ames,
Iowa, (1971) y J.A. Von Arx, The Genera of Fungi Sporelating
in Pure Culture, Verlag Von J. Cremer, 3301 Lehre (1970).

5 De acuerdo con el sistema taxonómico de Saccardo, esta cepa
pertenece a la clase Hyphomycetes familia Dematiaceae, género
Stachybotrys. En otras palabras, las propiedades de esta cepa,
caracterizada por la ausencia de ascocarpos y otros órganos
reproductores sexuales, la formación de fialoesporas de color
10 marrón oscuro a partir de fialuros y la reunión de las fialo-
esporas resultantes en una forma semicircular en los extremos
superiores del esterigmata, concuerdan bien con las propieda-
des del género Stachybotrys.

15 Las diversas características de esta cepa han sido iden-
tificadas con referencia a los manuales antes descritos y refe-
rencias bibliográficas como G.R. Bisby Ezt, Trans.Brit.Mycol.
Soc., 26: 133-143 (1943), R.K.Zuck,Ect, Mycología, 38: 69-76
(1946), G.L. Baron, Can, J. Bot., 39: 153-1957 (1961) y en com-
paración con las cepas tipo preservadas en el Instituto para
20 la Fermentación (IFO).

Como resultado de todas estas investigaciones, se ha con-
siderado que la cepa K-76 presenta todas las semejanzas con
Stachybotrys lobulata IFO 5369, porque las fialoesporas de es-
ta cepa K-76 presentan una protuberancia áspera verrugosa y son
25 de forma entre oval y elipsoidal. Sin embargo, aparecen dife-

1 rencias ya que el Stachybotrys lobulata presenta un esterig
ma que puede alcanzar un tamaño de 1 mm y mientras que la -
cepa K-76 presenta ramificación sencilla, la cepa Stachybotrys
5 lobulata tiene la propiedad de que desde un fialoforo se rami
fica y extiende otro fialoforo. En cuanto al crecimiento en
diversos medios de cultivo, la cepa K-76 produce una gran can
tidad de pigmento soluble y la formación de conidias es muy es
casa en medios de agar salvo medio de agar patata-glucosa y me
dio de agar harina de avena. Por otra parte, el Stachybotrys
10 lobulata se desarrolla muy rápidamente en diversos medios de
cultivo y se forma una colonia plana exenta de pliegues. La
formación de conidias es buena en casi todos los medios excep
to en el medio de agar Czapek en cuanto a tipificar el color
de la colonia. No se produce ningún pigmento soluble o solo se
15 produce escasamente.

De las diferencias anteriores, se deduce que la cepa
K-76 es una nueva cepa diferente de la Stachybotrys lobulata
y ha sido denominada Stachybotrys esp. K-76

(2) Stachybotrys esp. T-789

20 En la figura 3 se observa lo siguiente. Esta cepa presen
ta una morfología muy similar a la del Stachybotrys esp. K-76
aunque existen algunas diferencias en el tamaño de la colonia.

De la misma forma que en el Stachybotrys esp. K-76, se ha
comparado las propiedades microbiológicas anteriores con las en-
25 contradas en los manuales y en las referencias bibliográficas

1 antes mencionadas y con las cepas tipificadas en el IFO. En
consecuencia, se ha hallado que esta cepa es muy similar a
Stachybotrys lobulata IFO 5369 y Stachybotrys esp. K-76. Esta
5 cepa presenta buena formación de fialoesporas en un medio de
agar Czapek. Sin embargo, para las dos primeras cepas se ob-
serva una formación escasa de fialosporas en el medio agar de
Czapek. Esto constituye una diferencia de cultivo.

10 Además, como se ha indicado al tratar de Stachybotrys
esp. K-76 anteriormente, las propiedades morfológicas de es-
ta cepa son evidentemente diferentes de las de Stachybotrys
lobulata. Además, la región de pH para el crecimiento óptimo
de esta cepa es de 4,5 a 10,5. También en este aspecto esta
cepa difiere de la cepa K-76.

15 Por lo tanto, por las razones citadas, esta cepa se ha
considerado nueva y ha recibido la denominación de Stachybotrys
esp. T-789.

(3) Stachybotrys esp. T-791

20 En la figura 4 se observa lo siguiente. Los fialoforos
se ramifican simplemente y permanecen erectos. Las puntas de
los fialoforos son ligeramente combadas en forma de varilla.
Sin embargo, el combeo no es tan grande como el observado en
las cepas típicas de Stachybotrys echinata IFO 7525 y 8856.
Esta cepa presenta una anchura de las hifas de 4,0 a 4,5 micras
25 que es ligeramente mayor que la de los esterigmas. Los fialofo-
ros que se ramifican erectos con células de pie a partir de

1 hifas vegetativas o hifas aéreas contienen dos o tres septos
y tiene un tamaño de 40-80 x 3,0-3,5 micras. La pared celular
de los fialoforos no es erizada sino lisa.

5 Se forman de 3 a 6 fialuros a partir de la porción com-
bada en las puntas de los esterigmas. Además, en las puntas
de los fialoforos, se forman continuamente basipétalmente
fialoesporas de esféricas a subglobosas, de una sola célula,
con una protuberancia erizada y un tamaño de 4,3-5,2 x 3,0-
4,2 micras y también se forma una cadena de 24 a 70 conidias.
10 Los fialuros presentan forma oval y tienen un tamaño de 6,9-
10,7 x 3,5-4,7 micras. Los fialoforos son incoloros y los fia-
luros presentan color café (café, 3 pn) a negro.

15 El estado taxonómico de esta cepa con las propiedades
microbiológicas descritas fué investigado en los manuales an-
tes indicados en la sección que trata de la cepa K-76. Como
resultado de ello, se encontró que esta cepa pertenece al género
Stachybotrys (género Menmoniella). Específicamente, esta cepa
no presenta ascocarpos y otros órganos reproductores sexuales
y se forman continuamente a partir de fialuros fialoesporas ma-
20 rrón oscuro. Se forman largas cadenas de esporas. Las propie-
dades de esta cepa T-791 concuerdan con las del género
Stachybotrys (género Menmoniella).

25 Las diversas propiedades de esta cepa se han investigado
en las manuales y referencias bibliográficas antes citados ta-
les como R.K. Zuck y G. Smith, Mycología, 38: 69-76 (1964) y

1 G. Smith, Trans. Brit. Mycol. Soc., 45:387-394 (1962) y se han
comparado con las de cepas típicas preservadas en el IFO. Co-
mo resultado de ello, se ha considerado que como se forman con-
tinua y basipétalmente fialoesporas a partir de los fialuros
5 la cepa T-791 pertenece al género Menmoniella echinata carac-
terizado por Hohnel.

Sin embargo, de los informes de Zuck y Smith. se deduce
que esta cepa T-791 es una cepa análoga a Stachybotrys
echinata. Por lo tanto, se comparó con Stachybotrys echinata
10 IFO 7525 y 8856.

Morfológicamente, no se observan protuberancias erizadas
específicas de las dos cepas tipo sobre las paredes celulares
de los fialoforos en esta cepa T-791. Además, en las cepas tipo,
las puntas de los fialoforos se hinchan hasta 2-3 veces la an-
15 chura de las hifas del fialoforo; sin embargo, no se observa
ningún hinchamiento marcado en esta cepa. Además, las dos ce-
pas tipo presentan buen crecimiento en diversos medios de cul-
tivo, específicamente en medio de agar patata-glucosa y forman
colonias circulares, algo levantadas, y las hifas se adhieren
20 abundantemente. Además, la formación de conidias es evidente.
Por el contrario, la presente cepa presenta un crecimiento irre-
gular dentrítico como se ha indicado anteriormente y mala for-
mación de hifas y mala formación de conidias.

25 De las diferencias microbiológicas citadas, se deduce que
esta cepa es nueva y ha sido denominada Stachybotrys esp. T-791.

1 La indicación de los colores dada anteriormente y
en lo que sigue está de acuerdo con el método descrito en
Color Harmony Manual, Container Corporation of America
(1958).

5 Se han depositado muestras de las nuevas cepas,
Stachybotrys esp. K-76, Stachybotrys esp. T-789 y Stachybotrys
esp. T-791 en el Instituto de Investigaciones de Fermenta-
ción, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial, Japón,
10 bajo los números de depósito FERM-P nº 3802 y FERM-P nº
3803, respectivamente.

(b) Producción de compuestos de fórmula general (Ia) por los
microorganismos del género Stachybotrys

15 Específicamente, la preparación de los compuestos de
fórmula general (Ia) mediante los microorganismos del géne-
ro Stachybotrys antes descritos, se realiza de la siguiente
forma.

20 En primer lugar, se cultivan los microorganismos en
un medio que contiene las fuentes nutrientes y los aditi-
vos habituales. Las fuentes de nitrógeno generalmente uti-
lizadas como substrato de cultivo son, por ejemplo, harina
de soja, aceite de soja, licor de infusión de maíz, extrac-
to de levadura, levadura seca, harina de avena, extracto de
25 carne, caseína hidrolizada, sales amónicas y nitratos. Son

1 ejemplos de fuentes de carbono adecuadas la glucosa, glicerol,
maltosa, almidón, lactosa, sacarosa y melazas.

5 Son ejemplos de aditivos al medio de cultivo las
sales inorgánicas como carbonato cálcico, cloruro sódico, sul-
fato magnésico y ácido fosfórico. Si es necesario, el medio
de cultivo puede contener además cantidades traza de sales de
metales como hierro, cobre, manganeso y cinc.

10 El cultivo puede realizarse en un medio acuoso
corriente que contenga el substrato citado, empleando una téc-
nica de cultivo superficial o una técnica de cultivo sumergi-
do, con aireación y agitación. Es preferible el cultivo sumer-
gido con aireación y agitación. El cultivo puede realizarse
15 ventajosamente a una temperatura de unos 15 a unos 35°C, pre-
feriblemente de 20 a 32°C, durante un periodo de unos 3 a 7
días habitualmente, en condiciones de aireación comunes, mien-
tras se mantiene el pH del medio de cultivo a 3,5-11,5 aproxi-
madamente y preferiblemente entre 4,5 y 9,5.

20 Después de cultivar, la sustancia producida se re-
cupera del caldo de cultivo. El método de recuperación no es
especialmente crítico y puede emplearse cualquiera de los di-
versos métodos conocidos que utilizan las propiedades fisicoquí-
micas de las sustancias producidas.

25 Por ejemplo, la recuperación puede conseguirse me-
diante un método que utiliza las diferencias de solubilidad

1 entre los productos y las impurezas, un método que utiliza
las diferencias de poder absorbente y la afinidad por los
absorbentes comunes tales como carbón activo, XAD-2, gel
de sílice, resinas cambiadoras de ion o Sephadex marca re
5 gistrada para un producto de Pharmacia Fine Chemicals; un
método que utiliza las diferencias en el coeficiente de
distribución entre dos fases líquidas o una combinación de
dichos métodos.

10 Más específicamente, el caldo de cultivo se filtra
o centrifuga de forma convencional para separar las células.
Después se agrega metanol al líquido que sobrenada y la mez-
cla se agita y se deja en reposo durante 2 o 3 horas. El
precipitado se separa centrifugando de nuevo. El residuo se
15 extrae con un volumen igual de acetato de etilo y el disol-
vente se separa por destilación. El extracto se disuelve en
metanol y la solución metanólica se pasa por una columna de
carbón activo y el disolvente se separa del eluato por des-
tilación. El residuo se filtra a través del gel empleando
20 Sephadex LH-20. Las fracciones resultantes se someten cada
una de ellas a un ensayo de actividad anti-complemento en
la forma descrita más adelante, Se recogen las fracciones
activas y se destila el disolvente. Así se obtiene 6,7-di-
hidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahi-
25 dronaftalen-1-espiro-2'-(6', 7'-diformal-4'-hidroxi-2', 3'-

1 dihidrobenzofurano de la fórmula estructural (Ia) indicada
anteriormente.

2. Preparación de otros compuestos de fórmula general (I)

5 Los derivados de sesquiterpeno de fórmula general (I)
de esta invención distintos de los compuestos de fórmula
(Ia) pueden ser preparados a partir del compuesto de fór-
mula (Ia) como material de partida, mediante uno de los pro-
cedimientos descritos a continuación o mediante una combina-
ción de dos o más de estos procedimientos. Las reacciones im-
plicadas en estos procedimientos y los compuestos producidos
10 están descritos a continuación.

(A) Procedimiento (1)

15 Los compuestos de fórmula general (I), donde uno o
los dos radicales R^2 y R^3 representa un grupo carboxilo (de-
nominados en lo que sigue compuestos (IB)) pueden ser prepa-
rados por oxidación de los compuestos de fórmula (I) donde
uno o los dos radicales R^2 y R^3 representan un grupo formilo
(denominados en lo que sigue compuestos (IA)), por ejemplo
el compuesto (Ia).

20 La reacción de oxidación puede realizarse por méto-
dos convencionales de obtención de ácidos carboxílicos aro-
máticos a partir de aldehidos aromáticos. Son ejemplos de
métodos de oxidación aplicables un método que utiliza un
agente oxidante, un método que implica irradiación luminosa
25 en ausencia de catalizador, un método de oxidación por con-

1 tacto en presencia de un catalizador empleando aire u oxí-
 geno, un método de oxidación electrolítica en presencia de
 un compuesto de cobre o ácido sulfúrico y un método de oxi-
5 dación empleando una enzima. Debido a su sencillez de ope-
 ración, etc, facilidad de separación y purificación del
 producto de reacción, rendimiento, etc, se prefiere el méto-
 do que utiliza un agente oxidante y el método de oxidación
 por contacto empleando aire u oxígeno.

 No existe ninguna restricción particular sobre los
10 agentes oxidantes que pueden utilizarse en la realización
 del método empleando un agente oxidante. Puede utilizarse
 cualquier agente oxidante orgánico o inorgánico convencio-
 nal. Son ejemplos típicos de agentes oxidantes inorgánicos
 que pueden utilizarse las sales de permanganato, óxido de
15 manganeso, pirofosfato de manganeso, ácido crómico, sales
 de cromato, óxido de plata, nitrato de plata, reactivo de
 Tollens, óxido de oro, peróxido de níquel, dióxido de se-
 lenio, cloro, bromo, yodo, ácido hipocloroso, ácido hipo-
 bromoso, ácido perclórico, ácido peryódico, sales de los
20 ácidos hipohalógenos antes descritas y de ácidos perhalo-
 genados, ácido nítrico, ácido nitroso, tetróxido de nitró-
 geno, dióxido de nitrógeno, sales de cobalto como sulfato
 cobáltico o acetato cobáltico, sales de cerio como sulfato
 cérico, óxido cérico y perclorato cérico, peróxido de
25 hidrógeno y ozono. Son ejemplos de los agentes oxidantes

1 orgánicos que pueden utilizarse la N-bromosuccinimida, N-clo-
rosuccinimida, sodio-N-cloro-p-toluensulfonamida, sodio-N-
clorobencenosulfonamida, compuestos azo como azodicarboxila-
to de etilo y 4-fenil-1,2,4-triazolin-3,5-diona y ácidos
5 percarboxílicos como ácido perfórmico, ácido peracético,
ácido monoperoxifáltico, ácido trifluorperacético, ácido per-
benzoico y ácido metacloroperbenzoico.

De estos agentes oxidantes, los más preferidos son
las sales de permanganato, óxido de plata, peróxido de hi-
10 drógeno, ácido crómico, ácido peracético y ácido perbenzoi-
co y todavía mejor las sales de permanganato y el óxido de
plata.

Preferiblemente, el método de oxidación utilizando
un agente oxidante se lleva a cabo en un disolvente adecua-
15 do. Son ejemplos de disolventes adecuados que pueden utili-
zarse el agua y los disolventes orgánicos hidratados o
secos, v.g. alcoholes como metanol y etanol, piridina,
éteres como dioxano, tetrahidrofurano y éter dietílico, ce-
tonas como acetona y metiletilcetona, ácidos carboxílicos
20 como ácido acético y ácido propiónico, ésteres como acetato
de etilo, hidrocarburos aromáticos como benceno o cloroben-
ceno, hexametilfosforamida, dimetilformamida y dimetilsulfó-
xido. La cantidad adecuada de agente oxidante es alrededor
de 1 a 10 equivalentes, preferiblemente 1 a 2 equivalentes
25 por cada grupo formilo del compuesto de partida (IA), La

1 reacción puede llevarse a cabo entre -10 y 100°C aproximada-
mente y preferiblemente a 0-50°C, durante unos 30 minutos
a 24 horas.

5 El método de oxidación por contacto empleando un gas
que contenga oxígeno, como aire u oxígeno, puede ser reali-
zado, por ejemplo, haciendo borbotear oxígeno o aire por
una solución acuosa de hidróxido sódico o hidróxido potásico
en ausencia de catalizador o haciendo borbotear oxígeno
o aire por una solución acuosa en presencia de una sal
10 inorgánica como catalizador, tal como nitrato de cobalto,
acetato de manganeso o acetato de cobalto o en presencia
de un iniciador de radicales de peróxido de benzofilo o bajo
radiación luminosa. Entre estos procedimientos, es especial-
mente ventajoso el método de auto-oxidación por contacto
15 que consiste en hacer borbotear aire u oxígeno en ausencia
de catalizador, a través de una solución acuosa alcalina.
Esta reacción puede completarse agitando la mezcla reaccio-
nante, habitualmente entre la temperatura normal (alrede-
dor de 21-30°C) y unos 100°C, preferiblemente a 40-50°C, du-
20 rante unos 30 minutos a unas 24 horas, habitualmente duran-
te unos 30 minutos a 2 horas.

25 Después de la reacción de oxidación anterior, el
agente oxidante, si se utiliza, se descompone con un agente
reductor y después los subproductos inorgánicos se separan
por filtración, neutralización, destilación a vacío, etc.

1 Cuando se hace borbotear aire, etc, a través del sistema
reaccionante, la mezcla de reacción se trata preferiblemen-
te con carbón activo y después se acidula, por ejemplo con
ácido clorhídrico, para precipitar cristales. La mezcla de
5 reacción se extrae con un disolvente orgánico como acetato
de etilo y después se somete a un procedimiento convencio-
nal de separación y purificación como cromatografía en co-
lumna o cristalización fraccionada. Así, puede separarse
y recuperarse el compuesto deseado (IB).

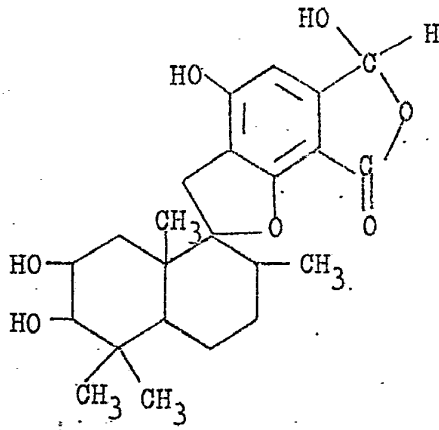
10 Entre los compuestos obtenidos por el procedimiento
antes descrito, un compuesto donde uno de los radicales
 R^2 y R^3 es un grupo formilo y el otro es un grupo carbo-
xilo (este compuesto será denominado en lo que sigue espe-
cíficamente compuesto (Ib)) tiene la estructura (Ib₁) con
15 un anillo de lactona en estado cristalino. En un disolvente,
especialmente en un disolvente básico, el compuesto (Ib)
se encuentra en forma de mezcla en equilibrio de compuesto
(Ib₁) y su tautómero, el ácido monocarboxílico (Ib₂) repre-
sentado a continuación:

20

25

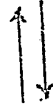
1

5

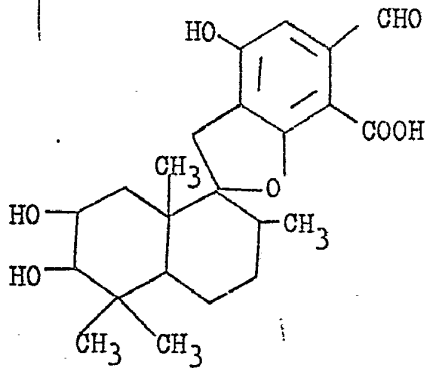


(Ib₁)

10



15



(Ib₂)

20

25

Las estructuras anteriores constituyen un ejemplo

1 de compuesto de fórmula (I) donde R^1 y R^5 son átomos de hidrógeno, R^2 es un grupo formilo, R^3 es un grupo carboxilo y R^4 y R^6 son grupos hidroxilo.

5 Esta estructura fué confirmada disolviendo el compuesto (Ib_1) (cristalino) en dimetilsulfóxido y midiendo el espectro de RMN del mismo con el tiempo. Veinte minutos después de la disolución, se observó un pico a 9,89 ppm que es una señal característica del protón aldehídico ($-CHO$) además de un pico a 6,36 ppm que es una señal característica de una lactona. La relación integrada del primer pico al último era alrededor de 73:27. Dos horas después de la disolución, aumentó algo el pico a 9,89 ppm, siendo la relación integrada alrededor de 70:30. Esta relación integrada alcanzada 2 horas después de la disolución apenas varió

10 después. Este resultado pone de manifiesto que el compuesto (Ib_1) y el compuesto (Ib_2) están presentes como mezcla molar 7:3 en equilibrio en el disolvente anterior. Cuando se utilizan como disolventes metanol o piridina, un análisis espectroscópico de RMN similar condujo a la confirmación del

15 compuesto (Ib_2) que es un tautómero del compuesto (Ib_1).

20

(B) Procedimiento (2)

Los compuestos de fórmula (I) donde por lo menos uno de los radicales R^2 o R^3 representa un grupo hidroxilo (a los que nos referiremos en adelante como compuestos

25 (IC)) pueden ser preparados por (1) reducción de los grupos

1 formilo o carboxilo de los compuestos (IA) o (IB) o (2)
reducción de los compuestos de fórmula general (I) donde
R² y R³ se combinan para formar un anillo de lactona de
fórmula $\begin{array}{c} \text{-CH-O-C-} \\ | \quad \parallel \\ \text{R}^2 \quad \text{O} \end{array}$, donde R⁹ es un átomo de hidrógeno o un
5 grupo hidroxilo (a los que nos referiremos como compuestos
(ID)).

La reducción anterior puede efectuarse por los dos
métodos siguientes.

10 La reducción de los grupos formilo puede realizarse
empleando diversos métodos convencionales de reducción de
aldehidos aromáticos a alcoholes aromáticos, por ejemplo
empleando un agente reductor, un método de reducción cata-
lítica o un método de reducción electrolítica.

15 En el método que utiliza un agente reductor, son ejem-
plos de agentes reductores adecuados que pueden utilizarse
los compuestos de hidruro de aluminio como hidruro de litio
y aluminio, hidruro de sodio y aluminio, hidruro de sodio
y trietoxialuminio e hidruro de sodio y bis(2-metoxietoxi)
20 aluminio; compuestos de hidruro de boro como borohidruro
sódico, borohidruro de litio, cianuro de borohidruro sódico
y diborano; hidruros de estaño orgánico como hidruro de tri-
n-butyl-estaño, hidruro de difenil-estaño e hidruro de tri-
25 etil-estaño e hidrosilanos como dimetilfenilsilano y trietil-
silano.

1 Pueden utilizarse diversos catalizadores convencionales en el método de reducción catalítica. Son ejemplos de catalizadores adecuados que pueden utilizarse el negro de paladio, paladio en carbón, níquel Raney y óxido de platino.

5 Una cantidad adecuada de catalizador, oscila entre alrededor de 1 a 50 % en peso, o preferiblemente de 5 a 15 % en peso basado en el peso del compuesto de partida representado por la fórmula general (Ia), (Ib) o (Id).

10 El método de reducción electrolítico puede realizarse, por ejemplo, empleando como cátodo mercurio, plomo, platino, cinc, níquel, paladio, grafito, etc y haciendo pasar una corriente continua de un voltaje de alrededor de 2 a 12 voltios, preferiblemente 4 a 6 voltios a través de una solución neutra o alcalina que contiene el compuesto.

15 Entre los métodos de reducción citados, se prefiere el método que utiliza un agente reductor debido a la facilidad de manipulación y al coste razonable del tratamiento. El uso de boro hidruro sódico como agente reductor es el más ventajoso. Con más detalle, este método se realiza en un disolvente inerte, por ejemplo una solución acuosa de un álcali como hidróxido sódico o hidróxido potásico, agua, un alcohol inferior como metanol o etanol, un éter como tetrahidrofurano o dioxano o una mezcla de estos disolventes. La cantidad adecuada de agente reductor utilizada es habitualmente por lo menos alrededor de un equivalente, preferiblemente de 1 a 8 equivalentes por equivalente de grupos formilo

20

25

1 del compuesto de partida que han de ser reducidos. La temperatura de reacción es habitualmente alrededor de 0 a 60°C, preferiblemente 5 a 25°C. En general, la reacción es completa en unos 30 minutos a unas 10 horas. Cuando se utiliza el compuesto (Ib) como material de partida en la reacción de reducción, debe introducirse previamente un material básico en el sistema de reacción para abrir el anillo de lactona. Ello es debido a que, en condiciones neutras o ácidas, el compuesto (Ib) se encuentra en forma de compuesto de lactona, del que es típico el compuesto de estructura (Ib₁) dado anteriormente, que es muy estable y no puede ser fácilmente reducido. Para este fin, deben emplearse los agentes reductores, los disolventes y las condiciones de reacción antes descritas en presencia de un material básico como hidróxido sódico, hidróxido potásico, carbonato sódico, carbonato potásico o hidrógeno-carbonato sódico, siendo la cantidad adecuada de material básico 1 mol o más por mol del material básico. Preferiblemente, en presencia del material básico, el compuesto de partida antes descrito se calienta con agitación a unos 0-80°C, preferiblemente a unos 40-60°C, durante 1 a 8 horas aproximadamente, junto con por lo menos unos 4 equivalentes, y preferiblemente de 4 a 16 equivalentes, de borohidruro sódico, como agente reductor, en un disolvente inerte convencional, como agua, metanol, etanol, tetrahidrofurano y dioxano, bien individualmente o como mezcla de disolventes.

25 La reducción de los grupos carboxilo del compuesto (Ib), c

1 de un compuesto (Ic) obtenido por el procedimiento antes des-
crito, en el que uno de los grupos R^2 y R^3 es un grupo hidroxi
metilo y el otro es un grupo carboxilo y se combinan para formar
un anillo de lactona(a los que nos referiremos en adelante como
5 compuestos (Id))puede llevarse a cabo de la siguiente forma. Se
hace reaccionar un compuesto de fórmula (Id)con por lo menos al-
rededor de 1 equivalente, y preferiblemente de 1 a 8 equivalen-
tes, por equivalente de compuesto (Id)de hidruro de litio y alu-
minio como agente reductor, en un disolvente inerte convencional
10 como dioxano o éter dietílico, a 0-60°C aproximadamente,preferi-
blemente 5 a 25°C,durante unos 30 minutos a unas 10 horas.

(C) Procedimiento (3)

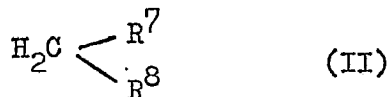
Los compuestos de fórmula (I) donde R^2 y R^3 están unidos
entre sí para formar un anillo de lactona de fórmula $-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-$
15 (a los que nos referiremos en adelante como compuestos
(Id))pueden prepararse fácilmente por ciclación con agua de li-
beración de compuestos de fórmula (Ic) obtenidos por el método
antes descrito, en los que uno de los radicales R^2 o R^3 represen-
ta un grupo hidroximetilo y el otro radical R^2 o R^3 representa
20 un grupo carboxilo, en ausencia de un disolvente por ciclación
con agua de liberación o en presencia de un disolvente adecuado.

La reacción anterior puede efectuarse calentando directame-
te a unos 100-200°C el material de partida.Alternativamente, el
material de partida se disuelve en un disolvente inerte adecuado
25 y se calienta en presencia de una cantidad catalítica(alrededor
de 0,01 a 50% en peso,preferiblemente 0,01 a 10 % en peso basad

1 en el peso de material de partida), de un compuesto ácido a
0-200°C aproximadamente. Preferiblemente a 60-150°C, durante 10
minutos a 24 horas, generalmente 2 a 10 horas. Son ejemplos de
5 disolventes adecuados que pueden utilizarse los hidrocarburos
aromáticos como benceno y tolueno, hidrocarburos halogenados co-
mo diclorometano, dicloroetano y cloroformo, éteres como éter di-
metílico, tetrahidrofurano, y dioxano, glicoles, tal como glicol
y alcoholes inferiores como etanol y metanol. Son ejemplos de
10 compuestos ácidos adecuados que pueden utilizarse, por ejemplo,
cloruro de hidrógeno, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido
polifosfórico, trifluoro de boro, ácido perclórico, ácido tri-
clorometanosulfónico, ácido trifluoroacético, ácido naftalensul-
fónico, ácido p-toluensulfónico, ácido bencenosulfónico y dime-
tilacetal de acetona.

15 (D) Procedimiento (4)

Los compuestos de fórmula general (I) donde uno o los dos
radicales R² o R³ representan el grupo de fórmula -CH=CR⁷R⁸, don-
de R⁷ y R⁸ son los definidos anteriormente, (a los que nos refe-
20 riremos en adelante como compuestos (IE)) pueden ser preparados
por deshidrocondensación de compuestos de fórmula (IA) con com-
puestos metilénicos activos de fórmula general (II):



25 donde R⁷ y R⁸ son los definidos anteriormente, en presencia de
un catalizador.

1 La reacción de deshidrocondensación puede efectuarse en au-
sencia de disolvente. Sin embargo, la reacción de deshidrocon-
densación puede efectuarse ventajosamente en un disolvente iner-
te convencional, por ejemplo una solución acuosa de un álcali
5 como hidróxido sódico, agua, un alcohol como metanol o etanol,
un éter como dioxano o tetrahidrofurano, un hidrocarburo aromá-
tico como benceno o tolueno, una amina terciaria como piridina
o trietilamina o un hidrocarburo halogenado como cloruro de me-
tileno, cloroformo o tetracloruro de carbono, Si se utiliza co-
10 mo disolvente una solución acuosa alcalina, piridina o trietila-
mina, también actúan como catalizadores y, por lo tanto, no es
necesario agregar otro catalizador, Cuando se emplean otros di-
solventes, debe utilizarse un catalizador, por ejemplo un ami-
noácido como β -alanina, una amina cíclica como piperidina o
15 morfolina, amoniaco, una amina como etilamina, dietilamina o
butilamina, sales de acetato de estas aminas, un acetato de me-
tal alcalino como acetato sódico o acetato potásico o una alco-
holato de metal alcalino como etilato sódico o metilato sódico,
20 en una cantidad de alrededor de 0,01 hasta un amplio exceso,
preferiblemente 0,05 a 30 % en peso basado en el peso del mate-
rial de partida.

25 La temperatura y el tiempo de reacción se determinan de
acuerdo con el disolvente utilizado, Cuando se emplea un disol-
vente no polar como benceno o cloroformo, la reacción se lleva a
cabo generalmente calentando el sistema de reacción a una tem-

1 temperatura próxima al punto de ebullición del disolvente y mien-
tras se separa el agua formada en la reacción como azeótropo,
se prosigue la reacción hasta que se ha separado la cantidad
teórica de agua. Cuando se emplea un disolvente que es bastan-
5 te miscible con el agua, como etanol, piridina o dioxano, la
reacción puede efectuarse habitualmente desde la temperatura
ambiente hasta unos 120°C, preferiblemente de 30 a 60°C, du-
rante unos 30 minutos a unas 24 horas, generalmente 30 minutos
a 3 horas sin separar el agua formada en la reacción.

10 La cantidad de compuesto metilénico activo de fórmula ge-
neral (I) utilizada en la reacción de deshidrocondensación
anterior es por lo menos alrededor de 1 equivalente, y pre-
feriblemente de 1 a 2 equivalentes, calculado sobre los gru-
pos formilo del compuesto de partida (IA).

15 (E) Procedimiento (5)

Los compuestos de fórmula general (I) donde uno o los
dos radicales R^2 y R^3 son grupos hidroxilo (a los que nos
referiremos en adelante como compuestos (IF) pueden prepa-
rarse fácilmente por reacción de compuestos (IA) con peró-
20 xidos, en un disolvente inerte.

Son ejemplos de disolventes inertes adecuados que
pueden utilizarse las soluciones acuosas de álcalis como
hidróxido sódico e hidróxido potásico, agua, piridina,
metanol, etanol, ácido acético, ácido propiónico, clorofor-
25

1 mo, cloruro de metileno, acetato de metilo, acetato de
etilo, benceno y tolueno. Son peróxidos adecuados que pue-
den utilizarse los peróxidos orgánicos o inorgánicos como
peróxido de hidrógeno, ácido peracético, ácido trifluorper-
5 acético, ácido m-cloroperbenzoico, ácido perbenzoico y
ácido perfumárico.

La temperatura de reacción es habitualmente alrededor
de 0 a 100°C, preferiblemente 0 a 50°C y la reacción se com-
pleta agitando la mezcla durante 1 a 24 horas aproxima-
10 damente. La cantidad de peróxido es como mínimo de unos 2 mo-
les, preferiblemente de 2 a 3 moles, por mol de compuesto
de partida (IA). Una vez terminada la reacción, se agrega un
agente neutralizante adecuado y la mezcla se concentra a pre-
sión reducida. El residuo se agrega sobre agua de hielo y
15 los cristales crudos precipitados se recogen por filtración,
se lavan con agua y se secan. Los cristales crudos secos se
disuelven en un disolvente adecuado como cloroformo y se se-
paran por cromatografía en columna. El compuesto deseado
(IF) se obtiene habitualmente como una fracción eluída con
20 metanol.

(F) Procedimiento (6)

Los compuestos de fórmula general (I) donde ambos ra-
dicales R^2 y R^3 representan grupos alcanoil(inferior)oximetilo
(a los que nos referiremos en adelante como compuestos (IG))
25 pueden ser preparados por acilación de los compuestos (IF)

1 obtenidos por el Procedimiento (5) antes descrito.

5 Como agente acilante en la reacción anterior pueden utilizarse los ácidos alcanicos inferiores tales como ácido acético, propiónico, butírico, isobutírico, etc, sus anhídridos o
10 sus haluros tales como cloruro de acetilo, bromuro de propionilo, bromuro de butirilo, bromuro de isobutirilo, etc, por ejemplo. Los anhídridos de ácidos alcanicos inferiores y los haluros de ácido son los preferidos. La reacción de acilación puede efectuarse en ausencia de un disolvente o en presencia de un disolvente inerte convencional y de un compuesto básico. Son ejemplos de disolventes inertes adecuados que pueden utilizarse los hidrocarburos aromáticos como benceno y tolueno, éteres como éter dietílico, dioxano o tetrahydrofuran, hidrocarburos halogenados como cloroformo y cloruro de metileno, aminas terciarias como piridina y trietilamina, dimetilsulfóxido y dimetilformamida. Los
15 compuestos básicos útiles son, por ejemplo, carbonato sódico, carbonato potásico, hidrógeno-carbonato sódico y aminas terciarias como piridina, quinolina, N,N-dimetilanilina o trietilamina, una cantidad adecuada del compuesto básico es por lo menos 1 mol, preferiblemente 1-2 moles por mol del compuesto de partida cuando se emplea un haluro ácido como agente acilante, y alrededor de 0,01-10% en peso basado en el peso del compuesto de partida cuando se emplea anhídrido ácido como agente acilante.

20 La reacción puede llevarse a cabo a una temperatura de unos
25 -60°C a 150°C , preferiblemente de 0 a 100°C y es completa en la

1 20 horas aproximadamente. La cantidad de agente acilante es por lo menos alrededor de 1 equivalente, habitualmente 1 a 20 equivalentes, calculado sobre los grupos hidroxilo del compuesto de partida (IF).

5 Cuando se utiliza como material de partida un compuesto de fórmula (IF) en el que no solamente R^2 y R^3 sino también por lo menos uno de los radicales $-OR^1, R^4$ y R^6 representa un grupo hidroxilo, en la reacción de acilación anterior, el otro o los otros grupos hidroxilo son algunas veces acilados también, dependiendo de las condiciones de acilación, especialmente de la elección de la temperatura de reacción o de la cantidad de agente acilante. Cuando se desea acilar selectivamente R^2 y R^3 en el caso de utilizar dicho compuesto de partida, el otro o los otros grupos hidroxilo pueden ser protegidos empleando técnicas convencionales adecuadas antes de la reacción y después de la acilación de R^2 y R^3 , se separan los grupos protectores.

10

15

(G) Procedimiento (7)

Los compuestos de fórmulas (IA) a (IG) obtenidos siguiendo los procedimientos antes descritos, donde R^1 representa un grupo alquilo inferior, pueden ser preparados por reacción de los correspondientes compuestos donde R^1 es un átomo de hidrógeno con agentes alquilantes conocidos.

20

Son ejemplos de agentes alquilantes adecuados que pueden utilizarse los haluros de alquilo como yoduro de metilo, bromuro de etilo, bromuro de propilo, bromuro de isopropilo, yoduro

25

1 de butilo y bromuro de t-butilo; sulfato de dialquilo como sulfato de dimetilo o sulfato de dietilo y diazoalcanos como diazometano o diazoetano.

5 La reacción de alquilación puede efectuarse entre la temperatura ambiente y unos 100°C, preferiblemente de 30 a 70°C, en un disolvente inerte convencional, por ejemplo una cetona como acetona o metiletilcetona, un éter como tetrahidrofurano o dioxano o un alcohol inferior como metanol o etanol, en presencia de un compuesto básico como carbonato potásico, carbonato sódico, 10 hidróxido sódico e hidróxido potásico, en una cantidad de alrededor de 0 a 10 moles, pref. 1-2 moles por mol del agente acilante. La reacción se completa habitualmente en 1 a 8 horas aproximadamente. La cantidad de agente alquilante empleada es por lo menos 15 alrededor de 1 mol, habitualmente de 1 a 5 moles, por mol de material de partida (IA) a (IG). Cuando se emplea diazometano como agente alquilante, puede omitirse el compuesto básico.

(H) Procedimiento (8)

20 Los compuestos de fórmulas (IA) a (IG) donde R¹ es un grupo alcanoílo inferior pueden obtenerse mediante una reacción de acilación conocida de los correspondiente compuestos en los que R¹ es un átomo de hidrógeno.

La reacción de acilación puede efectuarse de acuerdo con el Procedimiento (6) antes descrito.

25 Si se utilizan como material de partida los compuestos de fórmula general (I) que contienen un grupo hidroxilo en posición

1 nes distintas de la posición I', es probable que este grupo hi-
droxilo sea acilado también bajo las condiciones acilantes antes
descritas para el Procedimiento (6). Por lo tanto, cuando se aci-
lan estos compuestos de partida, el grupo hidroxilo en una posi-
5 ción distinta de la posición 4' es preferiblemente protegido de
forma convencional con un grupo protector adecuado.

(I) Procedimiento (9)

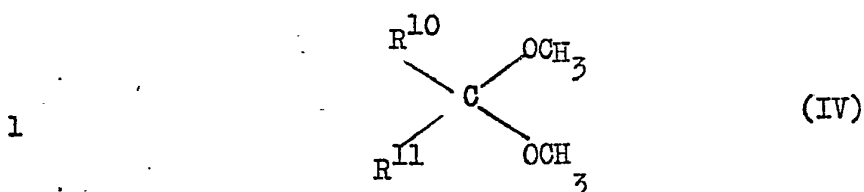
Los compuestos de fórmulas generales (IA) a (IG) donde R⁴ y
R⁶ son grupos alcanoiloxi inferior, pueden ser preparados por aci-
10 lación de los correspondientes compuestos donde R⁴ y R⁶ son gru-
pos hidroxilo. En esta reacción también pueden utilizarse las
mismas condiciones de acilación, protección y posterior elimina-
ción de grupos protectores por medio de otros grupos funcionales
que en el Procedimiento (6) anterior.

15 (J) Procedimiento (10)

Los compuestos de fórmulas generales (IA) a (IG) donde R⁴ y R⁶
son grupos alquilidendioxi inferior pueden ser preparados por
reacción de los correspondientes compuestos donde R⁴ y R⁶ son
grupos hidroxilo con aldehidos o cetonas de fórmula general (III)

20
$$\begin{array}{c} R^{10} \\ | \\ R^{11} \end{array} > C=O \quad (III)$$

donde R¹⁰ y R¹¹, que pueden ser iguales o diferentes, represen-
tan cada uno de ellos un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo
inferior, o con acetales o quetales de la siguiente fórmula
25 general (IV);



donde R^{10} y R^{11} , que pueden ser iguales o diferentes, son los de finidos anteriormente.

5 Esta reacción puede llevarse a cabo en presencia de un catalizador, en ausencia de un disolvente, o en presencia de un disolvente adecuado. Son ejemplos de disolventes adecuados que pueden utilizarse los hidrocarburos aromáticos como benceno y tolueno, éteres como éter dietílico y dioxano, hidrocarburos halogenados como cloroformo y cloruro de metileno y cetonas como acetona y metiletilcetona. Son ejemplos de catalizadores adecuados que pueden utilizarse los haluros de hidrógeno como cloruro de hidrógeno y bromuro de hidrógeno, los ácidos de Lewis como ácido sulfúrico cuya cantidad adecuada oscila entre alrededor de 0,1 a 20
10 % en peso, preferiblemente 5-10 % en peso basado en el peso del material de partida, cloruro de aluminio anhidro, cloruro de cinc anhidro y trifluoruro de boro y ácido p-toluensulfónico. Los compuestos de fórmulas generales (III) y (IV) utilizados para la
15 reacción se emplean habitualmente en exceso sobre los compuestos de fórmulas generales (IA) a (IG), ya que también actúan como disolvente. La temperatura de reacción adecuada es alrededor de -30°C a + 70°C, preferiblemente de 0°C a la temperatura ambiente. En estas condiciones, la reacción es completa en unos 30
20 minutos a 6 horas.

25

1 (K) Procedimiento (11)

Los compuestos de fórmulas generales (IA) a (IG) donde R^4 y R^5 unidos representan un grupo oxo (=O) pueden obtenerse por oxidación de los correspondientes compuestos donde R^4 es un grupo hidroxilo y R^5 es un átomo de hidrógeno.

5 La reacción de oxidación puede llevarse a cabo empleando diversos agentes oxidantes conocidos que se utilizan para oxidar los alcoholes secundarios a grupos oxo. Son ejemplos de agentes oxidantes adecuados que pueden utilizarse el ácido crómico, ácido bicrómico, sales de estos ácidos con metales como sodio o potasio, ácido nítrico, halógenos como bromo o cloro, agentes oxidantes de Oppenauer y reactivos de Jones.

15 La reacción se lleva a cabo preferiblemente en un disolvente adecuado. Son ejemplos de disolventes adecuados el agua, los alcoholes como metanol y etanol, los éteres como dioxano, tetrahidrofurano y éter dietílico, acetonas como acetona y metiletilcetona, los ácidos orgánicos como ácido acético y ácido propiónico, los ésteres como acetato de etilo, los hidrocarburos aromáticos como benceno y clorobenceno, los hidrocarburos halogenados como diclorometano y dicloroetano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido y piri-

20
25 La cantidad de agente oxidante puede seleccionarse apropiadamente dentro de amplios límites. Habitualmente,

1 se utiliza un exceso del agente oxidante.

La reacción puede llevarse a cabo entre -10°C y $+100^{\circ}\text{C}$ aproximadamente, preferiblemente entre 0°C y la temperatura ambiente, durante unos 30 minutos a unas 6 horas.

5 Si en la reacción de oxidación antes descrita se utilizan compuestos de partida con grupos que son afectados por la reacción de oxidación, como los grupos formilo o hidroxilo, es conveniente proteger estos grupos con grupos protectores adecuados, de forma convencional, de la misma manera que en

10 el Procedimiento (6) antes descrito. La separación de los grupos protectores después de la reacción puede efectuarse fácilmente por métodos convencionales.

Los derivados de sesquiterpeno representados por la fórmula general (I) de esta invención pueden obtenerse utilizando uno o más de los Procedimientos (1) a (11) aquí descritos, y secuencias adecuadas, y, si se desea, protegiendo

15 los centros reactivos seguido de eliminación de los grupos protectores y utilizando diversos procedimientos de separación y purificación.

20 Entre los derivados de sesquiterpeno de fórmula (I) de esta invención, los que contienen grupos ácidos, es decir, un grupo hidroxilo fenólico y/o un grupo carboxilo, pueden reaccionar con compuestos básicos para formar fácilmente las sales correspondientes. Esta invención también incluye las

25 sales de los derivados de sesquiterpeno de fórmula general (I).

1 Como ejemplos de compuestos básicos que pueden
utilizarse en la producción de las sales de los derivados
de sesquiterpeno de fórmula general (I), podemos citar los
hidróxidos y carbonatos de metales alcalinos y alcalino-
5 térreos, como hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidró-
xido cálcico, carbonato sódico, carbonato potásico e hidró-
geno-carbonato sódico. También pueden utilizarse como com-
puestos básicos las aminas orgánicas como metilamina, etil-
amina, isopropilamina, morfolina, piperazina, piperidina
10 y 3,4-dimetoxifenetilamina.

 La formación de sales utilizando compuestos básicos
puede realizarse fácilmente en un disolvente adecuado me-
diante técnicas convencionales de formación de sales. Son
ejemplos adecuados de disolventes que pueden utilizarse el
15 agua, los alcoholes inferiores como metanol, etanol y pro-
panol, los éteres como dioxano y tetrahidrofurano, acetona,
benceno, acetato de etilo, dimetilsulfóxido, dimetilformami-
da, cloruro de metileno y cloroformo. La formación de sales
puede realizarse entre la temperatura ambiente y unos 100°C,
20 preferiblemente entre la temperatura ambiente y 50°C, duran-
te unos 5 minutos a unas 6 horas, habitualmente en atmósfera
abierta o en condiciones exentas de oxígeno, preferiblemente
en atmósfera de un gas inerte como nitrógeno o argón. La can-
25 tidad de compuesto básico utilizada no es especialmente crí-
tica pero habitualmente una cantidad adecuada es por lo menos

1 alrededor de 1 equivalente, preferiblemente 1 a 2 equivalentes, calculado sobre los grupos ácidos del compuesto de partida.

5 Una vez completadas las reacciones aquí descritas, el compuesto final deseado puede separarse y purificarse fácilmente empleando procedimientos de separación convencionales. Por ejemplo, puede utilizarse como procedimiento de separación la destilación del disolvente, la extracción con disolvente, la precipitación, la recristalización, la 10 cromatografía en columna y la cromatografía preparativa.

III. AGENTES TERAPEUTICOS

15 Los derivados de sesquiterpeno resultantes de fórmula general (I) y sus sales de esta invención son útiles como agentes para el tratamiento de la nefritis y cuando se emplean como tales, se formulan en composiciones farmacéuticas junto con los vehículos habituales farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados que pueden utilizarse son, por ejemplo, diluyentes o excipientes como cargas, 20 extendedores, ligantes, agentes humectantes, desintegrantes, agentes tensoactivos y lubricantes, que son habitualmente empleados para preparar estas drogas de acuerdo con el método de administración.

25 Con fines terapéuticos pueden seleccionarse diversos métodos de administración de los agentes terapéuticos como agente de tratamiento de la nefritis. Son formas de dosifica-

1 ción típicas que pueden utilizarse las tabletas, píldoras,
 polvos, preparados líquidos, suspensiones, emulsiones,
 gránulos, cápsulas, supositorios y preparados inyectables
 (soluciones, emulsiones o suspensiones, etc.).

5 Para moldear una composición farmacéutica que con-
 tenga el derivado de sesquiterpeno de fórmula general (I)
 o una sal del mismo como ingrediente activo, en forma de
 tableta, puede emplearse una amplia variedad de vehículos
 conocidos en este campo. Son ejemplos de vehículos adecua-
10 dos los excipientes como lactosa, sacarosa, cloruro sódico,
 solución de glucosa, urea, almidón, carbonato cálcico,
 caolín, celulosa cristalina y ácido silícico; ligantes como
 agua, etanol, propanol, jarabe común, glucosa, solución
 de almidón, solución de gelatina, carboximetilcelulosa,
15 goma laca, metilcelulosa, fosfato potásico y polivinilpi-
 rrolidona; agentes desintegrantes como almidón seco, algi-
 nato sódico, agar en polvo, laminaria en polvo, hidróge-
 no-carbonato sódico, carbonato cálcico, Tween, laurilsul-
 fato sódico, monoglicérido de ácido esteárico, almidón y
20 lactosa; inhibidores de la desintegración como sacarosa,
 éster glicérfico de ácido esteárico, manteca de cacao y
 aceites hidrogenados; promotores de la absorción como bases
 amónicas cuaternarias y laurilsulfato sódico; agentes humec-
 tantes como glicerol y almidón; adsorbentes como almidón,
25 lactosa, caolín, bentonita y ácido silícico coloidal y lu-

1 bricantes como talco purificado, sales de ácido esteárico,
 ácido bórico en polvo macragol y polietilenglicol sólido.

 Para moldear la composición farmacéutica en forma
de píldora, puede utilizarse una amplia variedad de vehícu-
5 los convencionales conocidos en este campo. Son ejemplos de
vehículos y excipientes adecuados la glucosa, lactosa, almi-
dón, manteca de cacao, aceites vegetales endurecidos. caolín
y talco; ligantes como goma arábiga en polvo, tragacanto en
polvo, gelatina y etanol y desintegrantes como laminaria
10 y agar. Las píldoras, si se desea, pueden estar recubiertas
y adoptar la forma de píldoras recubiertas de azúcar, píldo-
ras recubiertas de gelatina, píldoras recubiertas entérica-
mente, píldoras recubiertas de una película o píldoras re-
cubiertas con dos o más capas.

15 En el moldeo de las composiciones farmacéuticas en
forma de supositorios, puede utilizarse una amplia varie-
dad de vehículos conocidos en este campo. Son ejemplos de
vehículos adecuados el polietilenglicol, manteca de cacao,
alcoholes superiores, ésteres de alcoholes superiores, gela-
20 tina y glicéridos semisintéticos.

 Cuando la composición farmacéutica se formula en un
preparado inyectable, la solución líquida resul-
tante es preferiblemente esterilizada y es isotónica con
respecto a la sangre. Para formular la composición farma-
25 cética en forma de solución, emulsión o suspensión líquida,

1 pueden emplearse todos los diluyentes habitualmente emplea-
dos en este campo. Son ejemplos de diluyentes adecuados
el agua, alcohol etílico, propilenglicol, alcohol isoestearí-
lico etoxilado, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbita-
5 no. Al agente terapéutico, v.g. el agente de tratamiento
de la nefritis, pueden incorporarse cloruro sódico, glucosa
o glicerol en cantidad suficiente para preparar soluciones
isotónicas. El agente terapéutico puede contener además los
auxiliares de disolución habituales, tampones, agentes anal-
10 gésicos y preservativos y opcionalmente agentes colorantes,
perfumes, aromas, edulcorantes y otras drogas.

La cantidad de compuesto de fórmula general (I) y
de sus sales de esta invención como ingrediente activo a
incorporar a una composición farmacéutica útil como agen-
15 te de tratamiento de la nefritis no es especialmente crítica
y puede variar dentro de amplios límites. Una cantidad
terapéuticamente efectiva adecuada es habitualmente alrede-
dor del 1 al 70 % en peso, preferiblemente de 5 al 50 % en
peso, calculado sobre la composición total.

20 No existe ninguna restricción especial sobre la
forma de utilizar el agente terapéutico como agente de
tratamiento de la nefritis y puede ser administrado por
las vías adecuadas para las formas particulares de dicho
agente terapéutico. Por ejemplo, las tabletas, píldoras,
25 soluciones, suspensiones y emulsiones líquidas, gránulos y

1 cápsulas se administran por vía oral. Los preparados inyec-
tables se administran intravenosamente, solos o junto con
agentes auxiliares ordinarios tales como glucosa y amino-
ácidos. Además, cuando sea necesario, el agente terapéuti-
5 co puede ser administrado individualmente por vía intramuscu-
lar, intracutánea, subcutánea o intraperitoneal. Los suposi-
torios se administran por vía rectal

La dosis del agente de tratamiento de la nefritis
se selecciona adecuadamente de acuerdo con la finalidad a
10 que se destina, los síntomas, etc. Habitualmente, una dosis
preferida del compuesto de esta invención es alrededor de
0,5 a 20 mg/kg de peso corporal al día.

Los compuestos de esta invención presentan actividad
anti-complemento y son útiles también como agentes terapéuticos
15 para las enfermedades autoinmunes, enfermedades del colágeno y
enfermedades reumáticas. Cada una de las cuales implica un sis-
tema complementario.

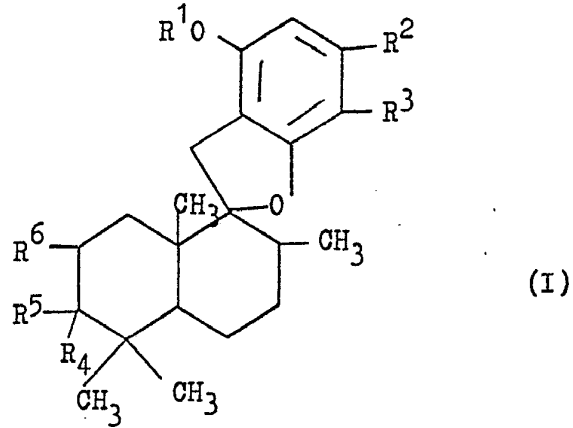
Los resultados de los ensayos sobre los efectos farma-
cológicos de los compuestos de esta invención de fórmula gene-
20 ral (I) y de sus sales están descritos a continuación.

(1) Compuestos ensayados

Se ensayaron los compuestos núms. 1 a 12 de esta in-
vención como se indica a continuación. Los compuestos
núms. 1 a 10 descritos por referencia a la fórmula general
25 (I) con los diversos sustituyentes de los mismos están mos-

1 trados en la Tabla I dada a continuación.

5



10

en donde en los compuestos representados en la tabla I a continuación: $R_4 = -OH$; $R_5 = -H$ y $R_6 = -OH$.

15

TABLA I

Compuesto n°	R^1	R^2	R^3
1	-H	-CHO	-CHO
2	-Na	-CHO	-COONa
3	-H	-OH	-OH
4	-H	-CH=C $\begin{matrix} \diagup \text{CN} \\ \diagdown \text{CN} \end{matrix}$	-CH=C $\begin{matrix} \diagup \text{CN} \\ \diagdown \text{CN} \end{matrix}$
5	-H	=CH=C $\begin{matrix} \diagup \text{CN} \\ \diagdown \text{COOC}_2\text{H}_5 \end{matrix}$	-CH=C $\begin{matrix} \diagup \text{CN} \\ \diagdown \text{COOC}_2\text{H}_5 \end{matrix}$
6	-H	-CH=C $\begin{matrix} \diagup \text{CN} \\ \diagdown \text{COOH} \end{matrix}$	-CH=C $\begin{matrix} \diagup \text{CN} \\ \diagdown \text{COOH} \end{matrix}$

25

1

TABLA I (continuación)

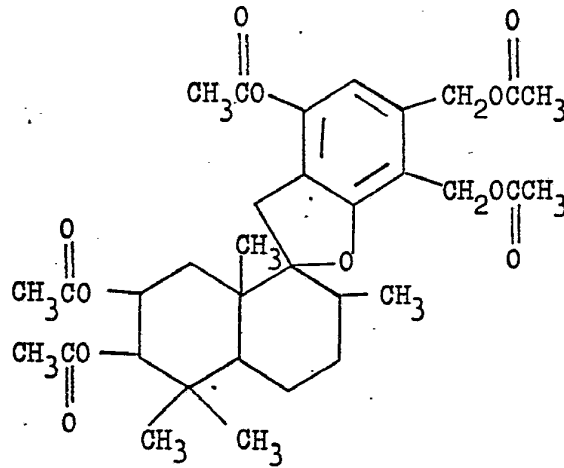
Compuesto n°	R ¹	R ²	R ³
7	-H	-CH=CHCOOH	-CH=CHCOOH
8	-H	-CH ₂ OH	-COOH
9	-H	-CH ₂ OH	-CH ₂ OH
10	-CH ₃	-CH ₂ OH	-CH ₂ OH

5

El compuesto n° 11 responde a la siguiente fórmula

la estructural:

10



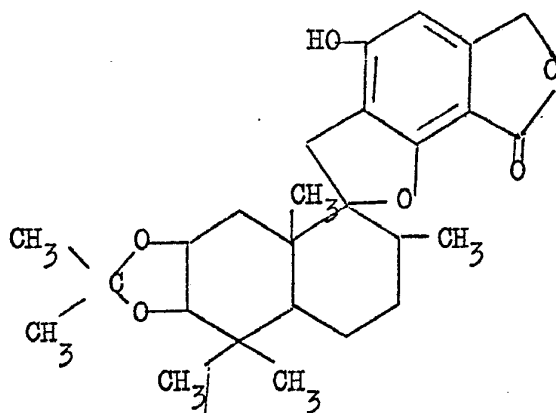
15

20

El compuesto n° 12 responde a la siguiente fórmula

la estructural:

25



(2) Actividad anti-complemento

15 La actividad anti-complemento fué medida y confirmada por el método de ensayo descrito en la publicación titulada "Meneki-Kagaku (Inmunoquímica)", en idioma japonés, Yuichi Yamamura y colaboradores, págs. 830-834, Asakura Shoten, Tokyo Japón (1973). Específicamente, se carga un tubo de ensayo con 0,5 ml de una dispersión acuosa de cada uno de los compuestos de ensayo, 0,5 ml de eritrocitos sensibilizados (AE) conteniendo 1×10^8 células/ml, 1 ml de una solución diluida al quintuple de una solución tampón de Veronal (GVB⁺⁺) que contiene gelatina, Ca⁺⁺, y Mg⁺⁺, y 0,5 ml de suero complemento (complemento de cobaya) diluido hasta 150 veces con GVB⁺⁺.

25 La mezcla se mantiene caliente a 37°C

1 durante 60 minutos. Después se añaden 5 ml. de una solu-
ción salina fisiológica enfriada con hielo y se centrifuga
la mezcla. Se mide la absorbencia del líquido sobrenadante
separado a DO_{413} y se determina el grado en que el compuesto
5 de ensayo inhibe la hemolisis de los eritrocitos sensibili-
zados. En la Tabla II se encuentra el valor de la actividad
inhibidora de la hemolisis al 50 % (Υ /ml), medido por el mé-
todo descrito.

(3) Toxicidad aguda

10 Se midieron los valores de la DL_{50} (mg/kg) de los com-
puestos de ensayo por administración intravenosa a ratones y
los resultados obtenidos también se encuentran en la siguien-
te Tabla II.

TABLA II

15	<u>Compuesto número</u>	<u>Valor de la actividad anti-complemento (Υ/ml)</u>	<u>DL_{50} (mg/kg)</u>
	1	10	40
	2	60	500
	3	80	150
20	4	40	200
	5	80	200
	6	40	250
	7	80	150
	8	125	-
25	9	500	-

1

TABLA II (continuación)

Compues- to n°	Valor de la actividad anti-complemento (γ /ml)	DL ₅₀ (mg/kg)
10	250	-
5	11	600
12	450	-
clorofilina	40	-

(4) Efecto terapéutico sobre la nefritis de tipo nefro-
toxina

10

La nefrotoxina de rata (abreviado a "NT") se obtuvo de la forma descrita a continuación. El corte de riñón de rata se homogeneizó con una cantidad igual de solución salina fisiológica. La mezcla homogeneizada se mezcló con coadyuvante completo de Freund (un producto de Difco Company) en una relación volumétrica de 1:1. Se inyectaron intramuscularmente 2 ml de la mezcla resultante a un conejo (peso corporal 3100 g) para inmunizarlo. Mes y medio más tarde, se tomó sangre del corazón del conejo y se obtuvo el suero. El suero resultante se inactivó a 56°C durante 30 minutos y después se sometió a desplazamiento salino con una solución acuosa saturada al 40 % de sulfato amónico y se fraccionó. La fracción de γ globulina (IgG) se recogió para obtener NT.

15

20

25

La evaluación se realizó utilizando ratas Wistar macho con un peso corporal de 150 a 160 g, con tres repeticiones para cada compuesto de ensayo. El compuesto de ensayo

1 se administró intraperitonealmente una vez cada 24 horas
durante 7 días. Una hora después de la administración del
compuesto de ensayo al tercer día, se aplicó la NT. La NT
se inyectó intravenosamente en una proporción de 1 ml en
5 una vena de la cola. Se utilizó clorofilina (CP) como com-
puesto comparativo y se utilizó como control una rata con
solución fisiológica salina.

El nivel de proteinuréea (cantidad total excretada
en la orina a lo largo de un periodo de 24 horas) se midió
10 por turbidimetria empleando albúmina de suero
bovina como control, mediante ácido sulfosalicílico.

Los resultados obtenidos se encuentran en la siguien
te Tabla III.

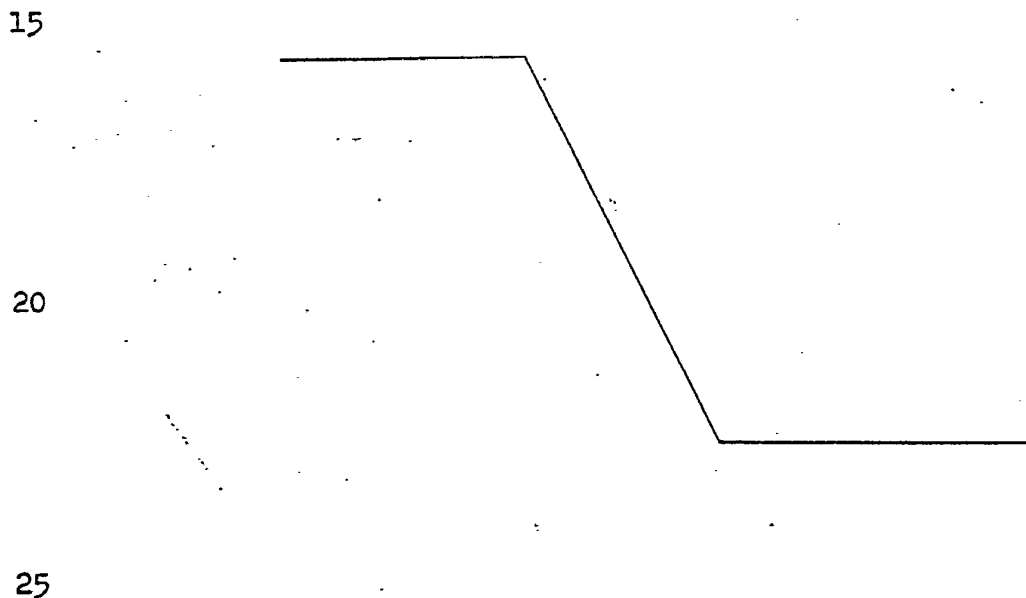


TABLA III

Compues to n.º	Dosis (mg por rata)	Número de re- peticiones	Número de días						
			1	4	7	10			
1	3	1	2,5**	1,5	0,8	8			
		2	4,3	2,1	1,8	10			
		3	1,7	1,1	0,9	7			
		promedio	2,8	1,6	1,2	8			
2	5	1	2,7	1,8	0,7	9			
		2	4,1	2,0	1,5	12			
		3	2,3	1,3	1,2	7			
		promedio	3,0	1,7	1,1	9			
6	5	1	2,1	1,9	0,8	13			
		2	1,5	1,2	0,9	7			
		3	3,7	3,3	1,4	9			
		promedio	2,5	1,8	1,0	10			

TABLA III (continuación)

Compuesto n°	Dosis (mg por rata)	Número de repeticiones	Número de días			
			1	4	7	10
Clorofilina (comparación)	5	1	2,4	1,5	0,9	9
		2	4,4	2,6	1,7	8
		3	3,2	2,1	3,5	6
		promedio	3,4	2,1	2,0	8
(Control)		1	13	16	21	29
		2	19	23	25	35
		3	11	18	24	40
		promedio	14	19	23	35

1 El número de días en la Tabla III se cuenta a partir del tiempo de administración del compuesto de ensayo que es una hora antes de la aplicación de la NT.

** La cantidad de proteinurea está medida en mg/día.

5 El nivel de proteinurea en una rata sana es de 0,5 a 5 mg/día. Cuando el nivel de proteinurea es superior a estos límites, especialmente cuando es superior a 10 mg/día, puede decirse con seguridad que se ha producido nefritis. Como puede observarse en los resultados de la Tabla
10 III, se produjo nefritis en el lote de control y, en el caso de los compuestos de esta invención y de la CP, la cantidad de proteinurea desde el momento de la administración de la NT hasta 10 días después de la administración es esencialmente la misma que la de una rata sana. Por lo tanto, puede verse
15 que la administración de los compuestos de esta invención inhibe las reacciones primarias y secundarias.

Cuando se realizó el mismo ensayo con los compuestos núms. 3 a 5 y 7 a 12 de la invención, todos ellos inhibieron la reacción primaria de la nefritis del tipo de nefrotoxina.

20 (5) Efectos terapéuticos sobre la nefritis tipo Heymann

25 Se utilizaron en el ensayo unas ratas macho Wistar con un peso corporal de 180 a 200 g. Se extrajo el corte del riñón de la rata y se homogeneizó con un volumen igual de solución salina fisiológica. La mezcla homogeneizada se centrifugó a 1500 G durante una hora. El líquido sobrena-

1 dante se purificó por el método de T.S. Edgington y colabo-
radores, Journal of Experimental Medicine, 127, 555 (19 68)
y se mezcló con coadyuvante completo de Freund 37 Ra (un
5 producto de la Difco Company) en una relación volumétrica
de 0,4:1. La mezcla resultante se inyectó intraperitoneal-
mente en ratas isologas en una proporción de 0,5 ml. por rata. Des-
pués se administró la misma cantidad de coadyuvante cada
2 semanas hasta que el nivel de proteinurea pasó de 100 mg/
día (este período fué alrededor de 6 a 8 semanas).

10 Cada uno de los compuestos de ensayo indicados en la
Tabla IV fué administrado intraperitonealmente a ratas que
padecían nefritis tipo Heymann (con un peso corporal de
300 a 350 g), una vez al día durante 7 días y después se mi-
dió la cantidad de proteinurea (mg/día) en la forma antes des-
15 crita. Se utilizó CP como compuesto comparativo y solución
salina fisiológica como control. Se realizaron tres repeticio-
nes para cada compuesto de ensayo. Los resultados obtenidos
se encuentran en la siguiente Tabla IV.

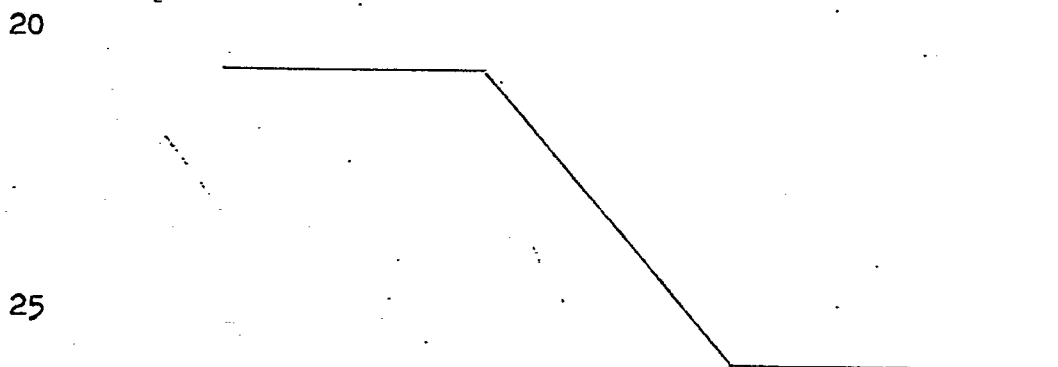


TABLA IV

Compues to n.º	Dosis (mg por rata)	Número de repeticiones	Antes de la administración	Número de días						
				1	4	7	14	21		
1	3	1	95	90	47	17	9	10		
		2	132	125	65	35	15	12		
		3	121	120	70	27	10	9		
		promedio	116	111	61	26	11	10		
2	5	1	117	109	59	23	13	9		
		2	132	127	67	41	17	13		
		3	105	114	51	25	11	12		
		promedio	118	117	59	30	14	11		
6	5	1	98	113	48	36	18	8		
		2	127	121	63	47	21	15		
		3	139	116	57	29	13	14		
		promedio	121	116	56	37	17	12		

TABLA IV (continuación)

Compuesto n°	Dosis (mg por rata)	Número de repeticiones	Antes de la administración	Número de días				
				1	4	7	14	21
Clorofilina (comparativo)	5	1	123	116	72	32	16	10
		2	117	108	63	29	12	8
		3	129	121	52	22	15	13
		promedio	123	115	62	28	14	10
(control)	-	1	135	127	132	135	114	126
		2	121	105	121	103	105	109
		3	137	117	135	121	109	132
		promedio	131	116	129	119	109	122

1 Dos o tres semanas después de comenzar los ensayos,
los pesos corporales de las ratas aumentaron hasta 400-500 g
y los niveles de proteinurea normales se cree que fueron
5 de 5 a 15 mg/día. Como puede observarse en los resultados
de la Tabla IV, los compuestos de esta invención pueden curar
la nefritis tipo Heymann.

 Cuando se realizó el mismo ensayo con los compuestos
núms. 3 a 5 y 7 a 12 de la invención, se halló que presentaban
también una actividad sustancial de curación de la
10 nefritis tipo Heymann.

IV. EJEMPLOS

 Para ilustrar esta invención con más detalle, se describe
en los siguientes ejemplos la producción de los compuestos
de esta invención de fórmula general (I) y la producción
15 de agentes de tratamiento de la nefritis que contiene los
compuestos de la invención de fórmula general (I) como
ingrediente activo en los siguientes ejemplos de referencia.
Salvo indicación en contrario, todas las partes, porcentajes,
relaciones y similares se dan en peso, y la temperatura
20 ambiente utilizada aquí es de alrededor de 5 a 25°C.

EJEMPLO 1

 Un matraz Sakaguchi de 500 ml se carga con 100 ml de
un medio de cultivo de la siguiente formulación y se cultiva
a 28°C y a pH 6, durante 4 días, con sacudidas de vaivén,
25 Stachybotrys esp. K-76.

1	<u>Formulación del medio de cultivo</u>	<u>%</u>
	Glicerol	0,5
	Almidón	1,0
	Lactosa	0,2
5	Harina de soja	0,5
	Extracto de levadura	0,1
	Extracto de malta	0,2
	CaCO ₃	0,3
	MgSO ₄	0,05
10	Un fermentador vibratorio de 30 litros se carga con	
	20 litros de un medio de cultivo de la formulación ante-	
	rior y un matraz del cultivo de siembra resultante se cul-	
	tiva en el medio de cultivo a 28°C durante 5 días con agi-	
	tación a 300 rpm, con un caudal de aire circulante de 1 li-	
15	tro por litro de medio de cultivo por minuto. El caldo de	
	cultivo resultante se centrifuga a una velocidad de 8000	
	rpm para separar las células microbianas. Al líquido sobre-	
	nadante se añaden 5 litros de metanol y la mezcla se agita	
	y después se deja en reposo durante 3 horas. Se centrifuga	
20	la mezcla para separar el precipitado, se separa los sólidos	
	formados y el sobrenadante se extrae con un volumen igual de	
	acetato de etilo. El disolvente de la capa de acetato de	
	etilo se separa por destilación a presión reducida. El resi-	
25	duo se disuelve en metanol y se pasa por una columna de car-	
	bón activo. El eluato se concentra a sequedad a presión re-	

1 ducida. La masa seca se disuelve en una mezcla de cloroformo
y acetato de etilo (1:1 en volumen) y se filtra a través de
gel en una columna de Sephadex LH-20. El filtrado se somete
5 a cromatografía en capa fina (empleando una mezcla de aceta-
to de etilo, cloroformo y ácido acético en una relación volu-
métrica de 50:50:2, como disolvente desarrollador) y se re-
coge una fracción con una actividad anti-complemento corres-
pondiente a $R_f = 0,34$. Alternativamente, el filtrado se
somete a cromatografía en capa fina (empleando una mezcla
10 de benceno, butanol y ácido acético en una relación volu-
métrica de 60:15:5 como disolvente desarrollador) y se recoge
una fracción con actividad anti-complemento, correspondiente
a $R_f = 0,58$. Por evaporación del disolvente de esta fracción
se obtienen 2,0 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,-
15 3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-difor-
mil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano), una sustancia ama-
rilla pálida débilmente ácida, con actividad anti-complemento.
La producción de este compuesto fué confirmada por las si-
guientes características fisicoquímicas:

20

(1) $[\alpha]_D^{20} = -48^\circ$ (c = 2,5, metanol)

(2) Análisis elemental para $C_{23}H_{30}O_6$:

Calculado : C, 68,64; H, 7,51

Encontrado: C, 68,58; H, 7,55 %.

(3) Espectro de absorción ultravioleta (UV)

25

$\lambda_{\max}^{\text{etanol}} = 246 \text{ nm } (\epsilon = 16.474)$

$= 307 \text{ nm } (\epsilon = 6.659).$

1 (4) Espectro de resonancia magnética nuclear (RMN)
El análisis de RMN se realizó empleando piridina-d₅ (so-
dio 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato (DSS) como disolvente.
El gráfico de RMN obtenido se encuentra en la Figura 5. Las con-
5 diciones de medida del RMN son las siguientes:
amplitud del espectro: 4 x 100
filtro : 0,1 segundos
potencia RF : 0,05 mG
tiempo de barrido : 5 minutos
10 anchura de barrido :: 10 ppm
final del barrido : 0 ppm

EJEMPLO 2

Un matraz Sakaguchi de 500 ml se carga con 100 ml de un me-
dio de cultivo de la siguiente formulación y se cultiva
15 Stachybotrys chartarum IFO 5369, una cepa conocida, en dicho me-
dio a 28°C durante 4 días, a pH 6, con sacudidas de vaivén.

<u>Formulación del medio de cultivo</u>	<u>%</u>
Glicerol	0,5
Almidón	1,0
20 Lactosa	0,2
Harina de soja	0,5
Extracto de levadura	0,1
Extracto de malta	0,2
CaCO ₃	0,3
25 MgSO ₄	0,05

1 Un fermentador vibratorio de 30 litros se carga con 20 litros
de un medio de cultivo de la formulación anterior y dos matra-
ces del cultivo de siembra resultantes se cultivan a 28°C du-
5 rante 5 días, agitando a una velocidad de 300 rpm y a un caudal
de aereación de 1 litro por cada litro de medio por minuto. El
caldo de cultivo resultante se centrifuga a una velocidad de
8000 rpm para separar las células microbianas. Al líquido sobre-
nadaante se añaden 5 litros de metanol y la mezcla se agita y se
deja en reposo durante 3 horas. Se centrifuga la mezcla y se se-
10 para el líquido que sobrenada. La mezcla se centrifuga y se se-
paran los componentes sólidos, el sobrenadante se extrae con un
volumen igual de acetato de etilo. El disolvente de la capa de
acetato de etilo se separa a presión reducida para concentrarlo
a sequedad. El residuo se disuelve en metanol y se pasa por una
15 columna de carbón activo. El eluato se concentra a sequedad a
presión reducida, se disuelve en una mezcla de cloroformo y ace-
tato de etilo 1:1 en volumen y se filtra a través de gel en una
columna de Sephadex LH-20. Se recogen las fracciones que contie-
nen picos activos correspondientes a los valores de Rf de cromatografía
20 en capa fina descritos en el Ejemplo 1. Por evaporación
del disolvente se obtienen 2,2 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetra-
metil-1,2,3,4,4a,5,6-7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-
(6', 7'-diformal-4'-hidroxi-2', 3'-dihidrobenzofurano, una sustan-
cia amarilla pálida débilmente ácida, con actividad anti-comple-
25 mento.

1 Este compuesto presenta las mismas características fisicoquímicas que el compuesto del Ejemplo 1 y la producción de este compuesto fué confirmada por estas características.

EJEMPLO 3

5 Se cultivó Stachybotrys esp. T-789 y se purificó de la misma forma que en el Ejemplo 1, a excepción de que se utilizó un medio de cultivo de la siguiente formulación, ajustado a pH 7,5 y la temperatura de cultivo se mantuvo a 32°C.

10	<u>Formulación del medio de cultivo</u>	<u>%</u>
	Glicerol	0,5
	Glucosa	1,2
	Licor de infusión de maíz	0,5
	Levadura seca	0,1
15	Extracto de malta	0,2
	MgSO ₄	0,05
	NaCl	0,3

20 Así se obtuvo 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,-3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-difor-
mil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano), una sustancia amarilla pálida débilmente ácida, con actividad anti-complemento. Las propiedades fisicoquímicas de este compuesto concuerdan con las del compuesto aislado y purificado del
25 Ejemplo 1.

1

EJEMPLO 4

Se cultivó Stachybotrys esp. T-791 y se purificó en la forma descrita en el Ejemplo 1, a excepción de que se empleó el medio de cultivo de la siguiente formulación ajustado a pH 5,5 y la temperatura de cultivo se mantuvo a 25°C.

5

<u>Formulación del medio de cultivo</u>	<u>%</u>
Glicerol	0,5
Almidón	1,0
10 Sacarosa	0,2
Harina de soja	0,5
Peptona	0,1
Extracto de malta	0,2
MgSO ₄	0,3
15 HCl	0,05

15

Así se obtuvo 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,-3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-diformil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano), una sustancia amarilla pálida débilmente ácida, con actividad anti-complemento. Las propiedades fisicoquímicas de este compuesto concuerdan con las del compuesto obtenido en el Ejemplo 1.

20

EJEMPLO 5

Se disuelven 2,1 g de nitrato de plata en 1 ml de agua y se añaden 3,5 ml de una solución acuosa 5,8M de hidróxido sódico. La mezcla se agita a la temperatura ambiente durante

25

1 20 minutos. Después se añade una solución de 1,0 g de 6,7-
dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-deca-
hidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-diformil-4'-hidroxi-2',3'-
5 Ejemplo 1, en 2 ml de etanol. La mezcla de reacción se agita
a la temperatura ambiente durante hora y media y el pH
se ajusta a 2 aproximadamente con ácido clorhídrico 2N. La
mezcla de reacción se extrae con un volumen igual de acetato
de etilo y el disolvente del extracto se separa por des-
10 tilación a presión reducida. El residuo se purifica por cro-
matografía en columna de gel de sílice (silicagel "Wako
C-200", un producto de la Wako Junyaku Kabushiki Kaisha,
empleando como eluyente cloroformo/acetato de etilo/ácido
acético 100:50:2 en volumen). Se recoge una fracción corres-
15 pondiente a $R_f = 0,37$ por cromatografía en capa fina (emplean-
do una mezcla de acetato de etilo, cloroformo y ácido acé-
tico 50:50:2 en volumen como disolvente desarrollador) o
una fracción correspondiente a $R_f = 0,71$ en cromatografía
en capa fina (empleando una mezcla de benceno, butanol y
20 ácido acético 60:15:5 en volumen como disolvente desarro-
llador). Por evaporación del disolvente de la fracción se
obtienen 700 mg de 4,6-dihidroxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahidro-
furo{3,4-g}benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-dihidroxi-2',5',5',-
8'a-tetrametil-1',2',3',4',4'a,5',6',8',8'a-decahidronafta-
25 leno) como sustancia amorfa de color amarillo pálido. El com-

1 puesto presenta las siguientes propiedades fisicoquímicas
y la producción de este compuesto fué confirmada por estas
propiedades.

5 (1) $[\alpha]_D^{20} = -44,8^\circ$ (c = 0,9, metanol)

(2) Análisis elemental para $C_{23}H_{30}O_7$:

Calculado : C, 66,03; H, 7,18

Encontrado: C, 65,93; H, 7,21.

(3) Espectro de resonancia magnética nuclear (RMN)

10 (i) El análisis de RMN se realizó empleando como
disolvente CD_3OD (DSS) y el gráfico de RMN
se encuentra en la Figura 6.

15 (ii) El análisis de RMN se realizó empleando piri-
dina- d_6 (DSS) como disolvente y el gráfico de
RMN resultante se encuentra en la Figura 7.

20 (iii) Se empleó como disolvente dimetilsulfóxido- d_6
y el análisis de RMN se realizó 2 horas y 63
horas después de la disolución. El gráfico de
RMN obtenido se encuentra en la Figura 8 (los
gráficos de RMN al cabo de 2 horas y 63 horas de
la disolución concuerdan entre sí).

Las condiciones de medida para obtener estos espectros
de RMN fueron las siguientes:

25

	<u>Figura 6</u>	<u>Figura 7</u>	<u>Figura 8</u>
Amplitud del espectro	9 x 100	5 x 100	8 x 100
Filtro	0,1 seg.	0,1 seg.	0,1 seg.
Potencia RF	0,05 mG	0,05 mG	0,05 mG
Tiempo de barrido	5 min.	5 min.	5 min.
Anchura de barrido	10 ppm	10 ppm	10 ppm
Final de barrido	0	0	0

EJEMPLO 6

10 Se suspenden 0,65 g de óxido de plata en una solución acuosa 1N de hidróxido sódico y se añaden, agitando a la temperatura ambiente, 1,0 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-diformal-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano).

15 La mezcla se agita a la misma temperatura durante una hora y el precipitado se lava cinco veces con 10 ml de agua. Se combinan el filtrado y las aguas de lavado y se agrega ácido clorhídrico concentrado 36% para ajustar el pH a 2-3 aproximadamente, seguido de enfriamiento, 0-10°C. Los cristales que precipitan se recogen por filtración, se lavan con 10 ml de agua de hielo cinco veces y se secan. Los cristales pulverulentos secos se disuelven en 50 ml de acetato de etilo y la materia insoluble se separa por filtración. El filtrado se concentra a un volumen de 5 ml a presión reducida. A la

20

25 solución concentrada se añaden 50 ml de ligroína y la mezcla

1 se agita bien y se deja enfriar, 0 a 10°C. Los cristales que precipitan se recogen por filtración, se lavan dos veces con
20 ml de ligroína y se secan para dar 1,01 g de 4,6-dihidroxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahidro-furo (3,4-g)benzofuran-2-espiro-
5 1'-(6',7'-dihidroxi-2',5',5',8'a-tetrametil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',8',8'a-decahidronaftaleno). Las propiedades físico-químicas del compuesto resultante concuerdan con las del compuesto obtenido en el Ejemplo 5.

EJEMPLO 7

10 Se disuelven 1,0 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-diformal-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano) en 50 ml de una solución acuosa al 10 % de hidróxido sódico y, mientras se hace borbotear aire en la solución a 50°C, se agita durante
15 30 minutos. La solución se acidula con ácido clorhídrico hasta pH 2-3 aproximadamente y los cristales que precipitan se recogen por filtración. Los cristales se lavan cinco veces con 10 ml de agua fría y se secan. Se disuelven los cristales en 50 ml de acetato de etilo y la materia insoluble se separa por filtración. El filtrado se trata con
20 carbón activo y se concentra hasta un volumen de 5 ml bajo presión reducida. La solución concentrada se agrega sobre 50 ml de ligroína con fuerte agitación. Los cristales que precipitan se recogen por filtración, se lavan con ligroína
25 y se secan para dar 0,72 g de 4,6-dihidroxi-8-oxo-2,3,6,8-

1 tetrahidro-furo {3,4-g} benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-dihidro-
xi-2',5',5',8'a-tetrametil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',8',8'a-
decahidronaftaleno). Las propiedades fisicoquímicas del
compuesto resultante concuerdan con las del compuesto obte-
5 nido en el Ejemplo 5.

EJEMPLO 8

Se disuelven 1,0 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrame-
til-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-
(6',7'-diformal-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano) en
10 25 ml de una solución acuosa 1N de hidróxido potásico y
se añaden poco a poco y agitando 50 ml de una solución
acuosa de 0,578 g de permanganato potásico. Cuando ha desa-
parecido el color del permanganato potásico, se interrumpe
la agitación. El precipitado se separa por filtración emplean-
do Celite como auxiliar de filtración. El filtrado se acidu-
15 la con ácido clorhídrico a un pH de 2-3 aproximadamente.
Los cristales que precipitan se recogen por filtración,
se lavan con 10 ml de agua tres veces y después se secan.
Los cristales secos se disuelven en 30 ml de acetato de eti-
20 lo. La materia insoluble se separa por filtración y el filtrado
se decolora con carbón activo y concentra a presión reducida. A
la solución concentrada se añaden 50 ml de ligroina y la mezcla
se agita. Los cristales que precipitan se recogen por fil-
tración, se lavan con ligroina y se secan a 60°C a presión
25 reducida para dar 0,9 g de 4,6-dihidroxi-8-oxo-2,3,6,8-te-

1 trahidro-furo {3,4-g} benzofuran-2-espiro-1'-(6', 7'-dihidro-
xi-2'5;5', 8'a -tetrametil-1', 2', 3', 4, 4a, 5', 6', 7', 8'8a
decahidronaftaleno). Las propiedades fisicoquímicas del compue
to resultante concuerdan con las del compuesto obtenido en el
5 Ejemplo 5.

EJEMPLO 9

A 5 ml de una solución acuosa 0,4N de hidróxido sódico y 5 ml de etanol se añaden 418 mg. de 4,6-dihidroxi-8-oxo-2
3,6,8-tetrahidro-furo {3,4-g} benzofuran-2-espiro-1'-(6', 7'-
10 dihidroxi-2',5', 5', 8'a-tetrametil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',
8',8'a-decahidronaftaleno). La mezcla se agita a 30-40°C duran
te 30 minutos en una corriente de nitrógeno. Una vez terminada
la reacción, el disolvente se separa por destilación a presión
reducida. El residuo se seca y se añaden 10 ml de acetona. La
15 porción soluble en acetona se separa por filtración. Los cris
tales crudos resultantes se recristalizan de agua/acetona, agr
gando acetona gota a gota a una solución acuosa, hasta que los
cristales se precipitan para dar 342 g de sal disódica de 6,7
dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidro
20 naftalen-1-espiro-2'-(7'-carboxilato-6'-formil-4'-óxido-2',3'
-dihidrobzofurano) en forma de sólido amorfo amarillo pálido.
El compuesto resultante presenta las siguientes propiedades
fisicoquímicas y la producción del compuesto fué confirmada
por estas propiedades..

25

$$(1) \left\{ \alpha \right\}_D^{20} = -44,2^\circ \quad (c = 1,25, H_2O)$$

(2) Análisis elemental para $C_{23}H_{28}O_7Na_2$:

1 Calculado : C, 59,74; H, 6,10

 Encontrado : C, 59,48; H, 5,91

(3) Espectro de absorción ultravioleta (UV)

5 $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ = 252 nm ($\epsilon = 20.500$)
 = 330 nm ($\epsilon = 45.900$)

(4) Espectro de resonancia magnética nuclear (RMN)

10 El análisis de RMN se realizó empleando D₂O (DSS)
 como disolvente. El gráfico de RMN resultante se encuentra
 en la Figura 9. Las condiciones de medida de RMN fueron
 las siguientes:

 Amplitud del espectro: 9 x 100

 Filtro : 0,1 segundos

 Potencia RF : 0,05 mG

15 Tiempo de barrido : 5 minutos

 Anchura de barrido : 10 ppm

 Final del barrido : 0 ppm

EJEMPLO 10

20 Se disuelven 418 mg de 4,6-dihidroxi-8-oxo-2,3,6,8-
 tetrahidro-furo[3,4-g]benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-dihidroxi-2',5',5',8'a-tetrametil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',8',-
 8'a-decahidronaftaleno) en 10 ml de acetato de etilo y se
 añaden con agitación 0,33 moles de una solución acuosa 6N
25 de hidróxido sódico. La mezcla se agita a la temperatura
 ambiente durante 10 minutos en corriente de nitrógeno. Los
 cristales que precipitan se recogen por filtración, se la-

1 van con 10 ml de acetato de etilo tres veces y se secan
para dar 390 mg de sal disódica de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-
tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espi-
5 ro-2'-(7'-carboxilato-6'-formil-4'-óxido-2',3'-dihidrobencofurano) como sólido amorfo amarillo pálido. Las propiedades fisicoquímicas del compuesto resultante concuerdan con las del compuesto obtenido en el Ejemplo 9.

EJEMPLO 11

10 Se disuelven 4,02 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-diformal-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobencofurano) en una solución acuosa 1N de hidróxido sódico y se añaden 14,2 g de una solución acuosa al 3 % de peróxido de hidrógeno. La mezcla se agita a 50°C durante 18 horas. Después se agrega
15 ácido acético para ajustar el pH de la solución a 3-4. Los cristales que precipitan se recogen por filtración, se lavan con agua y se secan.

20 Los cristales crudos obtenidos se cromatografían en una columna de gel de sílice empleando una mezcla de cloroformo y metanol (9:1 en volumen) como eluyente. El eluato final se recoge y se concentra a sequedad a presión reducida. Se agrega agua al residuo y los cristales resultantes se recogen por filtración, se lavan con agua y se secan. Así se obtienen
25 0,80 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(4',6',7'-trihidroxi-

1 2',3'-dihidrobencofurano) en forma de sólido amorfo pardo.
Cuando se mide el punto de fusión, se encuentra que este
compuesto se descompone gradualmente a unos 250°C. Las
propiedades fisicoquímicas del producto resultante son
5 las siguientes y la producción de este compuesto es confirma-
da por estas propiedades.

(1) Punto de fusión: descomposición gradual a unos
250°C y no se observa punto de fusión definido.

(2) Análisis elemental para $C_{21}H_{30}O_6$:

10 Calculado : C, 66,64; H, 7,99

Encontrado: C, 66,43; H, 8,3.

(3) Espectro de absorción ultravioleta (UV):

$\lambda_{\text{max}}^{\text{metanol}} = 219 \text{ nm } (\epsilon = 8700)$

$= 260 \text{ nm } (\epsilon = 2300).$

15 (4) Espectro de absorción infrarrojo (IR)

El producto tiene los siguientes valores de ν_{max}
(cm^{-1}) utilizando el método de la pastilla de KBr:

3450 (i), 2980 (i), 2980 (h), 1640 (m), 1480 (m),
20 1400 (d), 1330 (d), 1260 (d), 1220 (d), 1140 (d), 1120 (d),
1060 (d), 1020 (d), 1010 (d), 910 (d), 890 (d), 760 (d).

(i representa absorción intensa; m, absorción media;
d, absorción débil y h, hombro. Estas abreviaturas tendrán
los mismos significados posteriormente).

EJEMPLO 12

25

Se disuelven 2,01 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetra-

1 metil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-
(6',7'-diformil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano) en
50 ml de etanol y se añaden 1,45 g de malonotrilo y una
gota de piperidina como catalizador. La mezcla se agita
5 a 50°C durante 30 minutos. Una vez terminada la reacción,
la mezcla de reacción se concentra hasta un volumen de
10 ml a la presión reducida y se deja enfriar. Los crista-
les que precipitan se recogen por filtración y se lavan con eta-
nol frío(2-5°C). Los cristales crudos resultantes se disuel-
ven en 50 ml de una solución acuosa 1N de hidróxido sódico
10 y se tratan con carbón activo. Mientras se enfría con hielo
se añade ácido clorhídrico para acidular la solución(pH 2-3). Los
cristales que precipitan se recogen por filtración, se lavan
bien con agua y se secan. Así se obtienen 1,02 g de 6,7-dihid-
15 droxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidro-
naftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2,2-dicianovinil)-4'-hidro-
xi-2',3'-dihidrobenzofurano) en forma de sólido amorfo ama-
rillo. La producción de este compuesto es confirmada por
las siguientes propiedades fisicoquímicas.

20 (1) Punto de fusión: Se descompone gradualmente a unos
230°C y no se observa punto de fusión definido.

(2) Análisis elemental para $C_{29}H_{30}O_4N_4$:

Calculado : C, 69,86; H, 6,07; N, 11,24

Encontrado: C, 69,58; H, 6,32; N, 11,09.

25

(3) Espectro de absorción infrarrojo (IR):

1 El producto presenta los siguientes valores de ν_{\max}
(cm^{-1}): 3450 (i), 2980 (i), 2900 (h), 2210 (i), 1720 (d),
1660 (h), 1640 (i), 1580 (h), 1520 (d), 1470 (m), 1400 (m),
1380 (m), 1360 (m), 1340 (m), 1260 (m), 1200 (d), 1110 (d),
5 1050 (m), 1020 (d), 1000 (d), 980 (d), 960 (d), 940 (d),
900 (d), 840 (d), 760 (d), utilizando el método de la pastilla de KBr.

EJEMPLO 13

10 Se disuelven 2,01 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-
(6',7'-diformal-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano) en 50 ml
de etanol y se añaden 3 ml de cianoacetato de etilo. Después
se agregan como catalizador 3 gotas de piperidina y la mezcla se agita a 60°C durante 2 horas. Una vez terminada la
15 reacción, la mezcla se concentra a sequedad a presión reducida. El residuo se lava con una pequeña cantidad de ácido clorhídrico diluido(LN) se lava con agua y después se seca para formar cristales crudos. Los cristales crudos se disuelven en 50 ml de una mezcla de metanol y agua 1:1 en volumen y se trata con carbón activo. Se agrega un volumen igual de agua para precipitar cristales. Los cristales se recogen por filtración, se lavan con agua y se secan. Así se obtienen 1,89 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
20 5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2-ciano-2-etoxicarbonilvinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
25

1 como sólido amorfo pálido. La producción de este compuesto es confirmada por las siguientes propiedades fisicoquímicas:

(1) Punto de fusión: 161,0-167,0°C

(2) Análisis elemental para $C_{33}H_{40}O_8N_2$:

5 Calculado : C, 66,87; H, 6,80; N, 4,73

Encontrado: C, 66,63; H, 7,02; N, 4,51.

(3) Espectro de absorción infrarrojo (IR)

El producto presenta los siguientes valores de ν_{\max} (cm^{-1}), empleando el método de la pastilla de KBr:

10 3450 (i), 2970 (h), 2950 (m), 2900 (h), 2240 (d),
1740 (i), 1630 (i), 1470 (i), 1460 (h), 1400 (d), 1390 (d),
1250 (i), 1100 (m), 1050 (m), 1030 (m), 1020 (h), 970 (d),
950 (h), 940 (d), 900 (h), 890 (d), 860 (d).

EJEMPLO 14

15 Se disuelven 3,00 mg de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetra-
metil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-
(6',7'-diformal-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano) en
20 ml de piridina y se añaden 10,0 g de ácido cianoacético
y una gota de piperidina como catalizador. La mezcla se
20 agita a 50°C durante 5 horas. Una vez terminada la reacción,
la mezcla se concentra a sequedad. Se añaden 50 ml de agua
al residuo para obtener cristales. Estos cristales se reco-
gen por filtración, se lavan con agua, después con ácido
25 clorhídrico diluído y de nuevo con agua. Los cristales cru-
dos se disuelven en 100 ml de una solución acuosa al 10 %

1 de bicarbonato sódico. La materia insoluble se separa por filtración y el filtrado se acidula a pH 2-3 con ácido clorhídrico (1N) mientras se enfría con hielo. Los cristales que precipitan se recogen por filtración, se lavan con agua y se secan para dar 1,1 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2-ciano-2-carboxivinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano) en forma de sólido amorfo amarillo pálido. La producción de este compuesto se confirma por las siguientes propiedades fisicoquímicas.

(1) Punto de fusión: 217-223°C

(2) $[\alpha]_D^{20} = -23,2^\circ\text{C}$ (c = 0,8, metanol)

(3) Análisis elemental para $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_8$:

Calculado : C, 64,91; H, 6,01; N, 5,22

Encontrado: C, 64,63; H, 6,25; N, 5,01

(4) Espectro de absorción infrarrojo (IR)

El producto presenta los siguientes valores de ν_{max} (cm^{-1}), empleando el método de la pastilla de KBr:

3450 (i), 2950 (m), 2870 (h), 2240 (d), 1710 (i), 1660 (m), 1610 (i), 1580 (m), 1460 (m), 1440 (m), 1400 (m), 1300 (m), 1250 (m), 1200 (h), 1120 (d), 1100 (d), 1040 (d), 880 (d).

EJEMPLO 15

Se disuelven 1,0 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-

1 diformil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano) en 10 ml de
piridina y se añaden 1,0 g de ácido malónico y 3 gotas de
piperidina como catalizador. La mezcla se calienta a refluj
5 den a la mezcla 200 ml de agua y después se acidula a pH-2-3 con
ácido clorhídrico y se deja enfriar. El material alquitranoso
precipitado se recoge, se lava con agua, se disuelve
en 100 ml de metanol, se trata con carbón activo y se concentra
a sequedad a presión reducida. El residuo se recrystaliza
10 taliza en una mezcla de metanol y agua 1:1 en volumen para
dar 0,58 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,-
5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2-carboxivinil)-4'-
hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano) en forma
de sólido amorfo marrón claro. La producción de este compuesto
15 to es confirmada por las siguientes propiedades fisicoquímicas.

(1) Punto de fusión: 190-196°C

(2) Análisis elemental para $C_{27}H_{34}O_8$:

Calculado : C, 66,65; H, 7,04

Encontrado: C, 66,36; H, 7,31

20 (3) Espectro de absorción infrarrojo (IR)

El producto presenta los siguientes valores de ν_{max}
(cm^{-1}) por el método de la pastilla de KBr:

3450 (i), 2970 (m), 2950 (m), 2890 (h), 1690 (i),
1620 (i), 1470 (i), 1390 (i), 1350 (m), 1330 (m), 1290 (d),
25 1260 (m), 1200 (d), 1120 (d), 1070 (d), 1050 (m), 960 (d),

1 950 (m).

EJEMPLO 16

5 Se disuelven 1,0 g de borohidruro sódico en 20 ml de una solución acuosa 0,1N de hidróxido sódico. Se añade una solución de 0,9 g de 4,6-dihidroxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahi-
dro-furo(3,4-g)benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-dihidroxi-
2',5',5',8'a-tetrametil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',8',8'a-
decahidronaftaleno) en 10 ml de una solución acuosa al
10 1 % de hidróxido sódico. La solución mezclada se agita a 60°C du-
rante 18 horas, se enfría con hielo (alrededor de 2-5°C) en ácido
clorhídrico (1N). La solución se concentra a sequedad
a presión reducida y el residuo se disuelve en 50 ml de ace-
tato de etilo. La materia insoluble se separa por filtración.
15 El filtrado se lava con agua y se seca sobre sulfato sódico
anhidro. El sulfato sódico se separa por filtración y el
residuo se concentra a sequedad a presión reducida. El resi-
duo se recristaliza en 10 ml de una mezcla de metanol y agua
1:1 en volumen para dar 0,28 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-te-
20 trametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-
2'-(7'-carboxi-6'-hidroximetil-4'-hidroxi-2',3'-dihidro-
benzofurano) en forma de sólido amorfo incoloro. La produc-
ción de este compuesto es confirmada por las siguientes ca-
racterísticas fisicoquímicas.

25 (1) Punto de fusión: 212-216°V

(2) Análisis elemental para $C_{23}H_{32}O_7$:

1 Calculado : C, 65,71; H, 7,62

 Encontrado: C, 65,74; H, 7,47

 (3) Espectro de absorción infrarrojo (IR)

 El producto presenta los siguientes valores de ν_{\max}
5 (cm^{-1}) empleando el método de la pastilla de KBr:

 3450 (i), 2950 (h), 2920 (m), 2900 (h), 1740 (i),
1620 (m), 1475 (i), 1400 (d), 1360 (d), 1340 (m), 1260 (d),
1140 (d), 1080 (m), 1050 (d), 1030 (d), 960 (h), 950 (m),
780 (d).

10

EJEMPLO 17

15

20

25

Se disuelven 4,02 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-diformil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano) calentando (alrededor de 60-70°C) en 100 ml de benceno. Después se añaden 10 de melanato de dietilo y, como cabalizador, una gota de piperidin. El agua se separa por destilación azeotrópica. La destilación se realiza durante 4 horas y cuando se ha separado casi la cantidad teórica de agua, la mezcla se concentra a presión reducida. El material alquitranoso residual se lava con éter dietílico y la porción insoluble en éter se recoge por filtración, se seca y se recristaliza en una mezcla de éter dietílico y agua 1:2 en volumen. Así se obtienen 1,32 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-di-(2,2-dietoxicarbonilvinil)-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano) como

1 sólido amorfo incoloro. La producción de este compuesto
es confirmada por las siguientes propiedades fisicoquímicas.

(1) Punto de fusión: 138-142°C

(2) Análisis elemental para $C_{37}H_{50}O_{12}$:

5 Calculado : C, 64,70; H, 7,34

Encontrado: C, 64,43; H, 7,59

(3) Espectro de absorción infrarrojo (IR)

El compuesto presenta los siguientes valores de ν_{\max}
(cm^{-1}) siguiendo el método de la pastilla de KBr:

10 3450 (i), 2980 (h), 2950 (i), 2900 (i), 2880 (h),
1730 (i), 1680 (m), 1630 (h), 1600 (i), 1470 (m), 1440 (m),
1400 (m), 1320 (m), 1250 (i), 1120 (d), 1100 (d), 1080 (d),
1050 (d), 1020 (d), 970 (d), 950 (d), 890 (d), 760 (m).

EJEMPLO 18

15 Se disuelven 1,0 g de borohidruro sódico en 50 ml
de solución acuosa 1N de hidróxido sódico y se añade a la
temperatura ambiente una solución de 4,02 g de 6,7-dihidro-
xi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaf-
talen-1-espiro-2'-(6',7'-diformal-4'-hidroxi-2',3'-dihidro-
20 benzofurano) en 20 ml de solución acuosa 1N de hidróxido
sódico. La solución mezclada se agita durante 3 horas. Una
vez terminada la reacción, la mezcla se acidula a pH-2-3 en ácido
clorhídrico y se enfría con hielo (alrededor 2 a 5°C) los cristales
que precipitan se recogen por filtración, se lavan con agua y
25 se secan. Los cristales crudos se recrystalizan en 50 ml

1 de una mezcla de metanol y agua 1:5 en volumen para dar
2,51 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,-
6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-dihidroxi-
5 metil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano) como sólido
amorfo marrón claro. La producción de este compuesto se
confirma mediante las siguientes propiedades fisicoquímicas.

(1) Punto de fusión: Se descompone gradualmente a
unos 270°C y no presenta punto de fusión definido.

(2) Análisis elemental para $C_{23}H_{34}O_6$:

10 Calculado : C, 67,95; H, 8,43

Encontrado: C, 67,71; H, 8,66

(3) Espectro de absorción infrarrojo (IR)

El producto presenta los siguientes valores de ν_{max}
(cm^{-1}) por el método de la pastilla de KBr:

15 3450 (i), 2920 (m), 2880 (m), 1620 (m), 1600 (h),
1440 (m), 1390 (d), 1320 (d), 1260 (m), 1200 (d), 1100 (m),
1040 (d), 100 (d), 980 (d), 940 (d), 830 (d).

EJEMPLO 19

20 Se disuelven 1,00 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetra-
metil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-
(6',7'-dihidroximetil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano)
en 50 ml de metanol. La solución se agrega gota a gota so-
bre 20 ml de una solución recién preparada en éter dietíli-
co que contiene 1,0 g de diazometano, a través de un embu-
25 do de decantación y a la temperatura ambiente. La mezcla se

1 agita a la temperatura ambiente durante 2 horas y después se
enfria con hielo (alrededor de 2-5°C). Se hace borbotear clo
ruro de hidrogeno gaseoso a través de la mezcla para descom-
poner el exceso de diazometano. Después se añaden 100 ml de
5 agua y la mezcla se concentra a sequedad a presión reducida.
Al residuo se añaden 10 ml de una solución acuosa 0,1N de hi
dróxido sódico y la materia insoluble se recoge por filtra-
ción, se lava con agua y se seca. Así se obtienen 0,87 g de
10 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-deca
hidronaftalen-1-espiro-2'-(6'-dihidroximetil-4'-metoxi-2',3'-
dihidrobenzofurano) como sólido amorfo incoloro. La producción
de este compuesto es confirmada por las siguientes propieda-
des fisicoquímicas.

(1) Punto de fusión: 107-115°C

15

(2) Análisis elemental para $C_{24}H_{36}O_6$:

Calculado: C 68,54; H, 8,63

Encontrado: C, 68,31; H, 8,90

(3) Espectro de absorción infrarrojo (IR)

20

El producto presenta los siguientes valores de ν_{\max}^-
(cm^{-1}) por el método de la pastilla de KBr:

3220 (i), 2920 (m), 2880 (m), 1720 (d), 1620 (m),
1600 (i), 1500 (h), 1450 (m), 1420 (m), 1390 (d), 1320 (m),
1230 (m), 1200 (d), 1120 (i), 1040 (m), 1000 (m), 940 (d),
25 820 (d).

1

EJEMPLO 20

Se disuelven 2,00 g de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(7'-carboxi-6'-hidroximetil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano) en 50 ml de acetato de etilo y se añaden 10 ml de ácido p-toluensulfónico. La mezcla se calienta a reflujo. Después de la reacción, la mezcla se enfría a la temperatura ambiente, se lava con 10 ml de una solución acuosa 1N de hidróxido sódico y después bien con agua y se seca sobre sulfato sódico anhidro. El sulfato sódico se separa por filtración y el residuo se concentra a sequedad a presión reducida. Así se obtienen 1,45 g de 4-hidroxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahidro-furo{3,4-g}benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-dihidroxi-2',5',5',8'a-tetrametil-1',2',3',-4',1'a,5',6',7',8',8'a-decahidronaftaleno) en forma de sólido amorfo incoloro. La producción de este compuesto se confirma por las siguientes propiedades fisicoquímicas:

10

15

20

25

(1) Punto de fusión: 187-193°C

(2) Análisis elemental para $C_{23}H_{30}O_6$:

Calculado : C, 68,63; H, 7,51

Encontrado: C, 68,47; H, 7,70

(3) Espectro de absorción infrarrojo (IR):

El producto presenta los siguientes valores de ν_{\max} (cm^{-1}) por el método de la pastilla de KBr:

3280 (i), 2950 (m), 2890 (m), 1730 (i), 1610 (m),

1 1460 (i), 1330 (i), 1240 (d), 1130 (d), 1080 (m), 1040 (d),
1000 (d), 940 (m), 750 (m).

EJEMPLO 21

5 Se disuelven 100 mg de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrame-
til-1,2,3,4,4a;5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6', 7'-
dihidroximetil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano) en 2 ml de
piridina seca y se añade 1 ml de anhídrido acético. La mezcla
se deja en reposo durante la noche a la temperatura ambiente.
Se añade agua de hielo a la mezcla de reacción. El precipitado
10 se recoge por filtración y se recristaliza de una mezcla de
acetato de etilo y n-hexano, agregando n-hexano gota a gota a
una solución de acetato de etilo hasta que los cristales pre-
cipitan. Así se obtienen 105 mg de 7-acetiloxi-6-hidroxi-2,5,5,
8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-
15 -2'-(6', 7'-diacetiloximetil-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenzofu-
rano) como cristales blancos. La producción de este compuesto se
confirma por las siguientes propiedades fisicoquímicas.

(1) Punto de fusión: 78-83°C

20 (2) Análisis elemental para $C_{31}H_{42}O_{10}$:

Calculado: C, 64,79; H, 7,37

Encontrado: C, 64,51; H, 7,19

(3) Espectro de absorción infrarrojo (IR)

El producto presenta los siguientes valores de ν_{\max}
(cm^{-1}) por el método de la pastilla de KBr:

25 3430 (d), 2900 (m), 2860 (h), 1763 (h), 1730 (i),

1 1715 (h), 1620 (m), 1600 (m), 1465 (h), 1447 (h), 1430 (i),
1378 (h), 1364 (i), 1302 (m), 1250 (h), 1220 (i), 1195 (i),
1160 (h), 1126 (m), 1096 (i), 1020 (i), 1000 (h), 980 (m),
950 (m), 915 (h), 895 (h), 865 (h), 830 (h), 810 (h),
5 763 (d), 690 (h), 592 (d).

EJEMPLO 22

Se disuelven 100 mg de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-dihidroximetil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano) en 2 ml de piridina seca y se añade 1 ml de anhídrido acético. La mezcla se calienta a 100°C durante 2 horas. Se agrega agua de hielo a la mezcla de reacción. El precipitado resultante se recoge por filtración y se recristaliza de una mezcla de acetato de etilo y n-hexano agregando n-hexano gota a gota a una solución de acetato de etilo hasta que los cristales precipitan para dar 115 mg de 6,7-diacetiloxi-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-acetiloximetil-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenzofurano) como cristales blancos. La producción de este compuesto se confirma por las siguientes propiedades fisicoquímicas.

(1) Punto de fusión: 76-80°C

(2) Análisis elemental para $C_{33}H_{44}O_{11}$

Calculado: C, 64,27; H, 7,19

Encontrado: C, 64,12; H, 7,03

(3) Espectro de absorción infrarrojo (IR)

El producto presenta los siguientes valores de ν_{\max}

1 (cm⁻¹) por el método de la pastilla de KBr:

2920 (m), 2880 (h), 1760 (h), 1750 (h), 1730 (i),
1624 (h), 1603 (m), 1473 (h), 1457 (h), 1447 (h), 1428 (i),
1376 (h), 1363 (i), 1300 (i), 1260 (h), 1220 (i), 1195 (i),
5 1150 (h), 1125 (d), 1095 (i), 1035 (h), 1020 (i), 980 (h),
953 (i), 915 (m), 895 (h), 870 (h), 820 (d), 765 (d), 715
(d), 686 (d), 657 (d), 618 (h), 596 (m) 583 (m).

EJEMPLO 23

Se disuelven 100 mg de 7-acetiloxi-6-hidroxi-2,5,5,8a-
10 tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-
2'-(6',7'-diacetiloximetil)4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenczo-
furano) en 5 ml de acetona y se añaden gota a gota, enfrian-
do con hielo, 0,1 ml de reactivo de Jones. La mezcla se agi-
ta durante una hora. Se añade gota a gota isopropanol a la
15 mezcla de reacción para descomponer el exceso de reactivo
de Jones. Después se agrega agua de hielo y la mezcla se
extrae con acetato de etilo. La capa orgánica se lava con
agua y el disolvente se separa por destilación. El residuo
se recristaliza en una mezcla de acetona y n-hexano para
20 dar 72 mg de 7-acetiloxi-6-oxo-2,5,5,8a-tetrametil-1,2,3,4,-
4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-diacetil-
oximetil-4'-acetiloxi-2',3'-dihidrobenzofurano) como crista-
les blancos. La producción de este compuesto se confirma
por las siguientes propiedades físicoquímicas.

25 (1) Punto de fusión: 140-143°C

1

(2) Análisis elemental para $C_{31}H_{40}O_{10}$:

Calculado : C, 65,02; H, 7,04

Encontrado: C, 65,17; H, 7,13.

(3) Espectro de absorción infrarrojo (IR)

5

El producto presenta los siguientes valores de ν_{\max} (cm^{-1}) por el método de la pastilla de KBr:

2900 (m), 2880 (h), 1766 (h), 1750 (i), 1720 (i),
1628 (m), 1600 (m), 1456 (i), 1427 (i), 1380 (h), 1363 (i),
1340 (h), 1300 (i), 1265 (h), 1220 (i), 1185 (i), 1120 (m),
1083 (i), 1070 (h), 1030 (i), 1013 (h), 1000 (h), 970 (m),
950 (i), 936 (h), 926 (h), 905 (m), 895 (m), 870 (m), 854 (h),
827 (d), 780 (d), 766 (d), 738 (d), 712 (d), 666 (d), 610 (d),
588 (d).

10

EJEMPLO 24

15

20

25

Se disuelven 100 mg de 4-hidroxi-8-oxo-2,3,6,8-tetra-
hidro-furo [3,4-g]benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-dihidroxi-
2',5',5',8'a-tetrametil-1',2',3',4',4'a,5',6',7',8',8'a-
decahidronaftaleno) en 2 ml de acetona seca y se añaden
1 ml de 2,2-dimetoxipropano y después 5 mg de ácido p-to-
luensulfónico anhidro. La mezcla se agita a la temperatura
ambiente durante 2 horas. Se agrega agua a la solución reac-
cionante y la mezcla se extrae con acetato de etilo. La ca-
pa orgánica se lava con una solución acuosa saturada de bicarbonat
sódico y después con agua. El disolvente se separa por eva-
poración y el residuo se recrystaliza de una mezcla de aceta-

1 to de etilo y n-hexano para dar 83 mg de 4-hidroxi-8-oxo-
2,3,6,8-tetrahidro-furo {3,4-g}benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-
isopropilidendioxi-2',5',5',8'a-tetrametil-1',2',3',4',4'a,-
5',6',7',8',8'a-decahidronaftaleno) como cristales blancos.

5 La producción de este compuesto se confirma por las siguien-
tes propiedades fisicoquímicas.

(1) Punto de fusión: 142-150°C

(2) Análisis elemental para $C_{26}H_{33}O_6$:

Calculado : C, 70,73; H, 7,53

10 Encontrado: C, 70,51; H, 7,38

(3) Espectro de absorción infrarrojo (IR)

El producto presenta los siguientes valores de ν_{max}
por el método de la pastilla de KBr:

15 3280 (d), 2920 (m), 2880 (h), 1760 (h), 1733 (i),
1620 (h), 1608 (m), 1463 (i), 1387 (h), 1368 (m), 1354 (i),
1330 (i), 1300 (h), 1255 (h), 1238 (m), 1216 (i), 1178 (d),
1153 (d), 1124 (d), 1106 (d), 1080 (m), 1060 (m), 1043 (i),
1016 (m), 1005 (h), 985 (h), 950 (m), 923 (d), 895 (d),
20 870 (h), 858 (m), 784 (h), 768 (h), 753 (m).

EJEMPLO 25

25 Se disuelven 100 mg de 6,7-dihidroxi-2,5,5,8a-tetrame-
til-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-
(6',7'-dihidroximetil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobzofurano)
en 2 ml de acetona seca y se añaden 1 ml de 2,2-dimetoxipro-
pano y 5 mg de ácido p-toluensulfónico anhidro. La mezcla se

1 agita durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Se agrega
agua de hielo a la solución reaccionante y la mezcla se extrae
con acetato de etilo. La capa orgánica se lava con una solución
acuosa saturada de bicarbonato sódico y después con agua y el d
5 solvente se separa por destilación. El residuo se purifica por
cromatografía en columna de gel de sílice y se recristaliza de
una mezcla de acetato de etilo y n-hexano agregando n-hexano go
ta a gota a una solución de acetato de etilo hasta que los cris
tales precipitan para dar 21 mg de 6,7-isopropilidendioxi-2,5,5
10 8a,-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro
-2'-(6',7'-hidroximetil-4'-hidroxi-2',3'-dihidrobenzofurano) como
cristales blancos. La producción de este compuesto se confirma
por las siguientes propiedades fisicoquímicas.

(1) Punto de fusión: Se descompone gradualmente a unos
15 200°C con coloración y no presenta un punto de fusión definido.

(2) Análisis elemental para $C_{26}H_{38}O_6$:

Calculado: C, 69,93; H, 8,58

Encontrado: C, 69,71; H, 8,39

(3) Espectro de absorción infrarrojo (IR)

20 El producto presenta los siguientes valores de $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$
por el método de la pastilla de KBr:

3360 (m), 3040 (m), 2920 (m), 2880 (h), 1735 (d), 1700 (d)
1618 (m), 1458 (h), 1440 (i), 1386 (h), 1368 (i), 1346 (m),
1313 (m), 1253 (m), 1237 (m), 1215 (m), 1180 (d), 1150 (d),
25 1106 (i), 1083 (m), 1052 (h), 1017 (i), 1026 (m), 1000 (i),

1 974 (i), 952 (m), 920 (d), 895 (d), 870 (h), 857 (m), 837 (m),
785 (a), 765 (h), 700 (d), 670 (d).

EJEMPLO 26

5 Se disuelven 100 mg de 4-hidroxi-8-oxo-2,3,6,8-tetrahi-
dro-furo {3,4-g} benzofuran-2-espiro-1'-(6',7'-isopropilidendi-
xi-2',5', 5',8'a-tetrametil-1',2', 3', 4', 4'a, 5',-6',7'8'a-
decahidronaftaleno) en 5 ml de éter dietílico seco y se añaden
5 mg de hidruro de litio y aluminio mientras se enfría con agua
de hielo. La mezcla se agita durante una hora. Se añade agua de
10 hielo a la solución reaccionante y la solución se acidula débil-
mente (pH 3-5) en ácido clorhídrico 1N y se extrae después con
acetato de etilo. La capa orgánica se lava con agua y se destila
el disolvente. El residuo se recristaliza de una mezcla de aceta-
to de etilo y n-hexano agregando n-hexano gota a gota a una so-
15 lución de acetato de etilo hasta que los cristales precipiten
para dar 75 mg de 6,7-isopropilidendioxi-2,5,5,-8a-tetrametil-
1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidronaftalen-1-espiro-2'-(6',7'-hi-
droximetil-4'-hidroxi-2', 3'-dihidrobenzofurano) como cristales
blancos. Las propiedades fisicoquímicas del compuesto resultante
20 concuerdan con las del compuesto obtenido en el Ejemplo 25.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

Compuesto n° 1 de la invención	500 mg
Glucosa	250 mg
Agua destilada para inyección hasta una 25 cantidad total de	5 ml

1 La sal disódica (III) del compuesto n° 1 de esta
invención y la glucosa se disuelven en agua destilada para
inyección. La solución se introduce en una ampolla de 5 ml.
El aire se purga con nitrógeno y la ampolla se calienta a
5 121°C durante 15 minutos para esterilizar la solución y
obtener un preparado inyectable.

EJEMPLO DE REFERENCIA 2

Compuesto n° 2 de la invención	500 mg
Sulfito sódico	5 mg
10 Agua destilada para inyección hasta una cantidad total de	5 ml

De forma similar al Ejemplo de Referencia 1, se pre-
para una solución inyectable.

EJEMPLO DE REFERENCIA 3

15 Compuesto n° 6 de la invención	500 mg
Sulfito sódico	5 mg
Agua destilada para inyección hasta una cantidad total de	5 ml

De forma similar al Ejemplo de Referencia 1, se
prepara una solución inyectable.

20

EJEMPLO DE REFERENCIA 4

Compuesto n° 6 de la invención	750 mg
Base de glicérido semisintético hasta una cantidad total de	2000 mg

25 El compuesto n° 6 de esta invención se agrega a la
base de glicérido semisintético y se mezclan y suspenden

1 a 50°C. La mezcla se cuele en un molde y se deja enfriar espontáneamente. Se saca el producto obteniéndose un supositorio.

EJEMPLO DE REFERENCIA 5

5 Compuesto n° 2 de la invención 750 mg
Vitamina E 90 mg
Base de glicérido semisintético hasta una cantidad total de 2000 mg

10 De forma similar al Ejemplo de Referencia 4, se obtiene un supositorio.

EJEMPLO DE REFERENCIA 6

15 Compuesto n° 2 de la invención 150 g
Avicel (marca registrada para un producto de la Asahi Kasei Kabushiki Kaisha) 40 g
Almidón de maíz 30 g
Estearato magnésico 2 g
TC-5 (marca registrada de hidroxipropil metilcelulosa) 10 g
Polietilenglicol 6000 3 g
Aceite de castor 40 g
20 Butanol 40 g

25 El compuesto n° 2, el Avicel, el almidón de maíz y el estearato magnésico se mezclan y se muelen y después se comprimen en tabletas (r = 10 mm) para cubrirlas con azúcar. Las tabletas resultantes se recubren con un agente de recubrimiento en forma de película constituido por

1 TC-5, polietilenglicol 6000, aceite de castor y metanol para producir tabletas recubiertas con una película.

EJEMPLO DE REFERENCIA 7

	Compuesto n° 6 de la invención	100 g
5	Avicel	40 g
	Almidón de maíz	30 g
	Estearato magnésico	2 g
	Copolímero de acrilato de metilo/ácido metacrílico	5,7 g
10	Triacetina	0,6 g
	Etanol	50,4 g

15 El compuesto n° 6, el Avicel, el almidón de maíz y el estearato magnésico se mezclan y se muelen y después se comprimen en tabletas (r = 10 mm) para recubrirlas con azúcar. Las tabletas resultantes se recubren con un agente de formación de película constituido por el copolímero de acrilato de metilo/ácido metacrílico, la triacetina y el etanol para formar tabletas con recubrimiento entérico.

EJEMPLO DE REFERENCIA 8

20	Compuesto n° 6 de la invención	150,0 g
	Acido cítrico	1,0 g
	Lactosa	33,5 g
	Fosfato dicálcico	70,0 g
	Plon F-68 (Pluronic F-68)	30,0 g
25	Laurilsulfato sódico	15,0 g

1	Polivinilpirrolidona	15,0 g
	Polietilenglicol (Carbowax 1500)	4,5 g
	Polietilenglicol (Carbowax 6000)	45,0 g
	Almidón de maíz	30,0 g
5	Laurilsulfato sódico seco	3,0 g
	Estearato magnésico seco	3,0 g
	Etanol	c.s.

Se mezclan el compuesto n° 6, el ácido cítrico, la lactosa, el fosfato dicálcico, el Plon F-68 y el laurilsulfato sódico. La mezcla se tamiza a través de un tamiz del n° 60 y se granula en mojado con una solución alcohólica constituida por la polivinilpirrolidona, el Carbowax 1500 y el Carbowax 6000. Opcionalmente se agrega etanol para convertir el polvo en una masa pastosa. Se agrega el almidón de maíz y se continúa mezclando hasta que se forman partículas uniformes. Las partículas se pasan por un tamiz del n° 10, se colocan en una bandeja y se secan en una estufa a 100°C durante 12 a 14 horas. Las partículas secas se pasan por un tamiz del n° 16 y se mezclan con el laurilsulfato sódico seco y el estearato magnésico seco. La mezcla se comprime a la forma deseada empleando una máquina de comprimidos.

Los núcleos así obtenidos se tratan con un barniz y se pulveriza talco sobre el mismo para evitar la absorción de humedad. Los núcleos se recubren con una capa de

1 imprimación y después con un barniz el número de veces
necesario para la administración por vía oral. Para redon-
dear y alisar las tabletas por completo, se aplica una nue-
va capa de imprimación y otro recubrimiento liso y un recu-
5 brimiento coloreado hasta que se obtiene el color deseado.
Después de secas, las tabletas recubiertas se pulimentan
para formar tabletas de brillo uniforme.

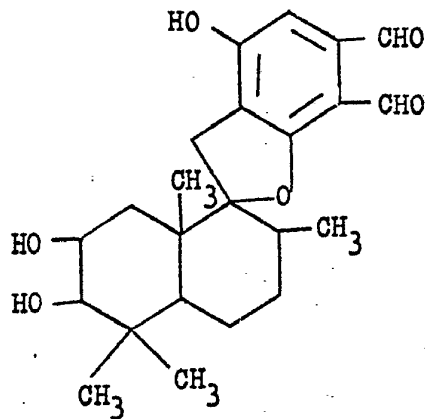
En resumen, la Patente de Invención que se soli-
cita deberá recaer sobre las siguientes:

10

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para la preparación de un
derivado de sesquiterpeno, de fórmula (Ia):

15



(Ia)

20

que consiste en cultivar aerobiamente un microorganismo del
género Stachybotrys en un medio de cultivo que contiene fuen-
tes asimilables de nitrógeno, carbono, sales inorgánicas y -
25 minerales traza, a un pH de 3,5 a 11,5 aproximadamente y a

1 una temperatura de 15 a 35º C aproximadamente y recuperar
el producto resultante de fórmula (Ia) del caldo de culti-
vo.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1,
5 que comprende además la etapa adicional de convertir el pro-
ducto resultante en una de sus sales farmacéuticamente acep-
tables.

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1,
donde el microorganismo está seleccionado entre el grupo for-
10 mado por Stachybotrys alternans IFO 9355, Stachybotrys char-
tarum IFO 5369, Stachybotrys chartarum IFO 7222, Stachybotrys
cilindrospora 8858, Stachybotrys echinata 7525, Stachybotrys
reniformis 7067, Stachybotrys esp. K-76, Stachybotrys esp. -
T-789 y Stachybotrys esp. T-791.

15 4.- Un procedimiento según la reivindicación 3,
donde el microorganismo está seleccionado entre el grupo for-
mado por Stachybotrys esp. K-76, Stachybotrys esp. T-789 y
Stachybotrys esp. T-791.

20 5.- Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN DERIVADO DE SES-
QUITERPENO.

1

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de ciento diecisiete páginas mecanografiadas y dibujos adjuntos.

5

Madrid, 12 de Mayo 1.978
BERNARDO UNGRIA
P.P.



10

15

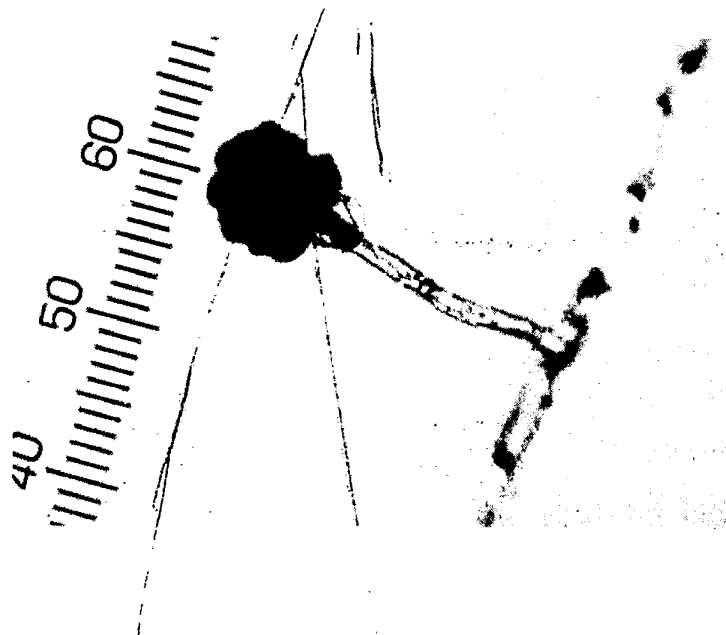
20

25

FIG.2



FIG.1



- ESCALA VARIABLE
Madrid, 12 de mayo de 1.978
BERNARDO UNGRÍA
P.E.

FIG.4

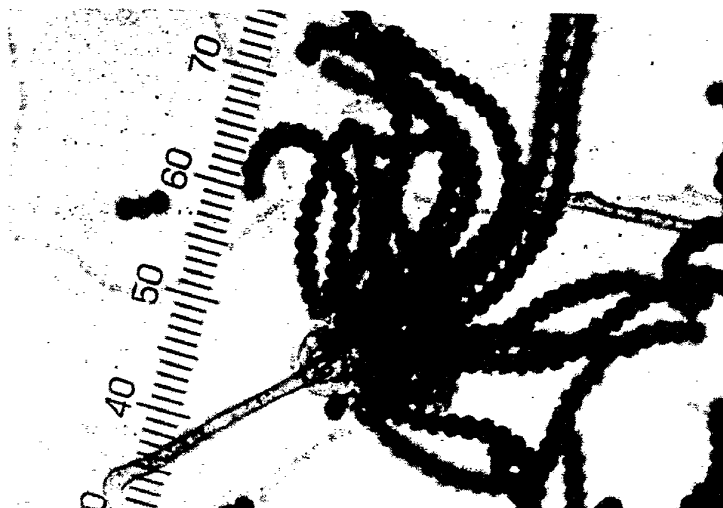
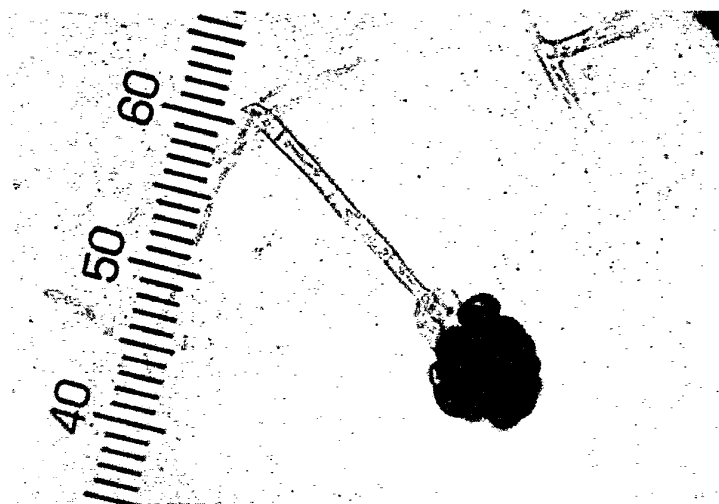
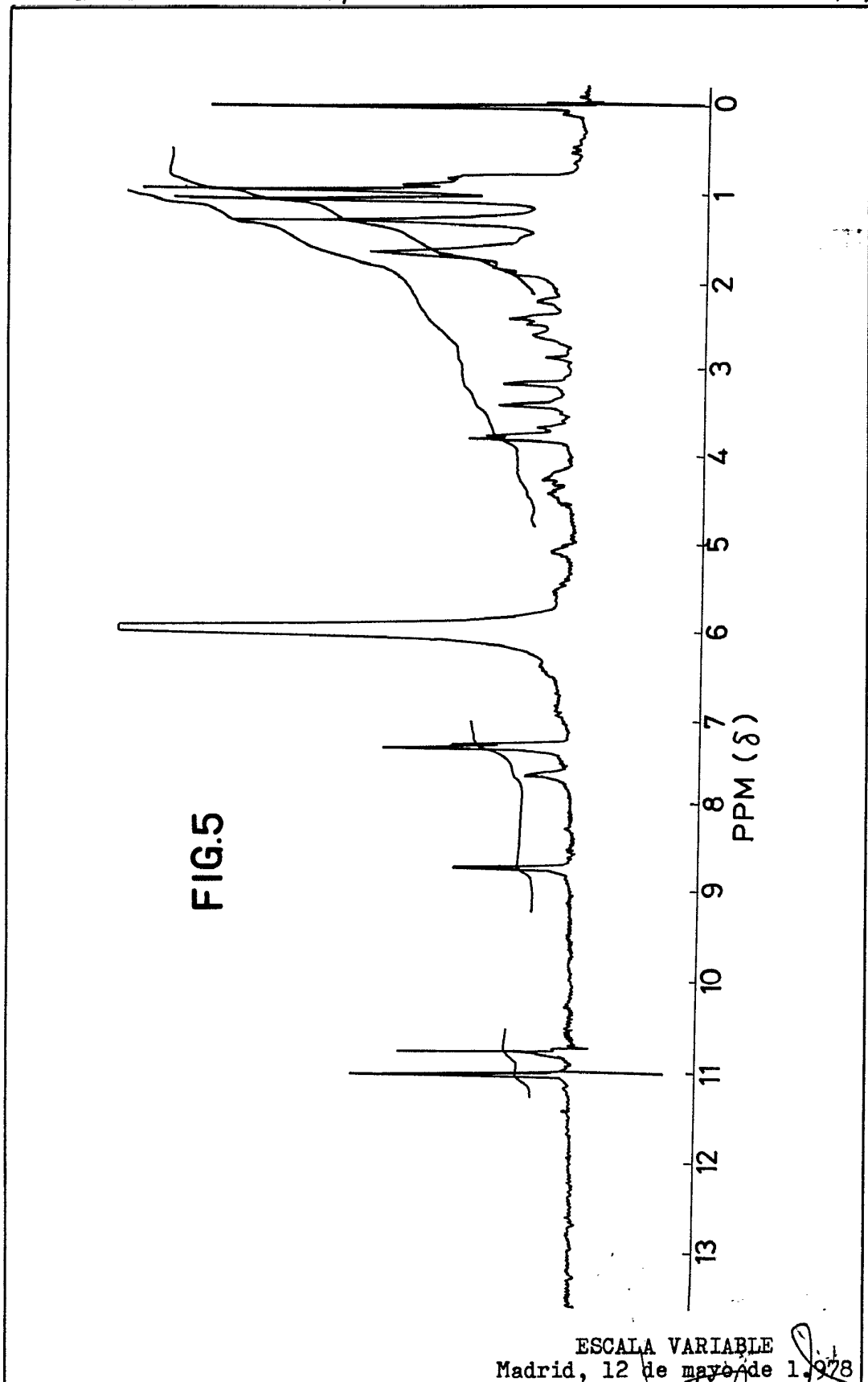


FIG.3



ESCALA VARIABLE
Madrid, 12 de mayo 1.978
BERNARDO UNGRIA
P.F.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Bernardo Ungria', is written over the typed text.



ESCALA VARIABLE
Madrid, 12 de mayo de 1.978
BERNARDO UNGER
P.D.

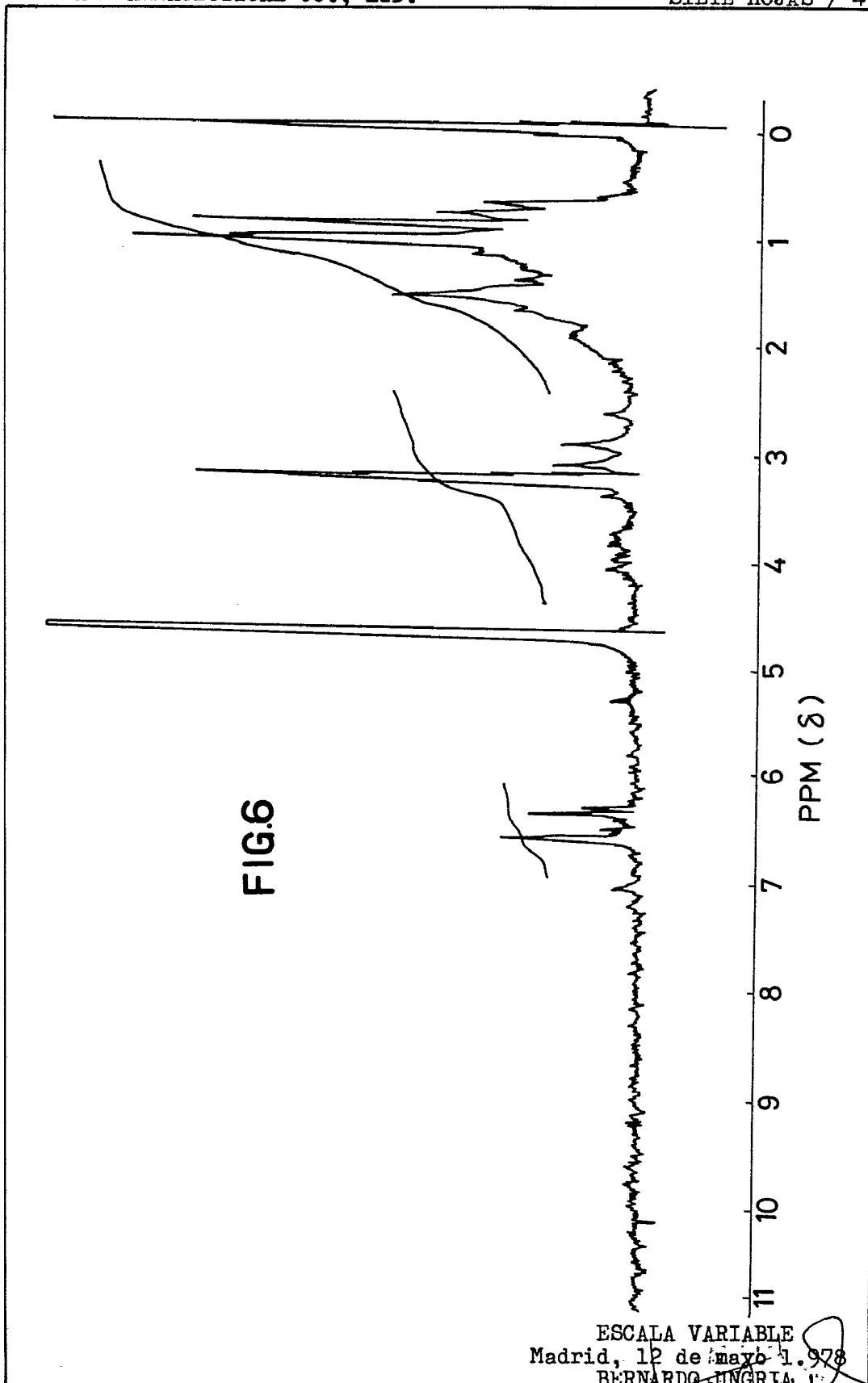


FIG.6

ESCALA VARIABLE
Madrid, 12 de mayo 1.978
BERNARDO UNGRIA
P.P.

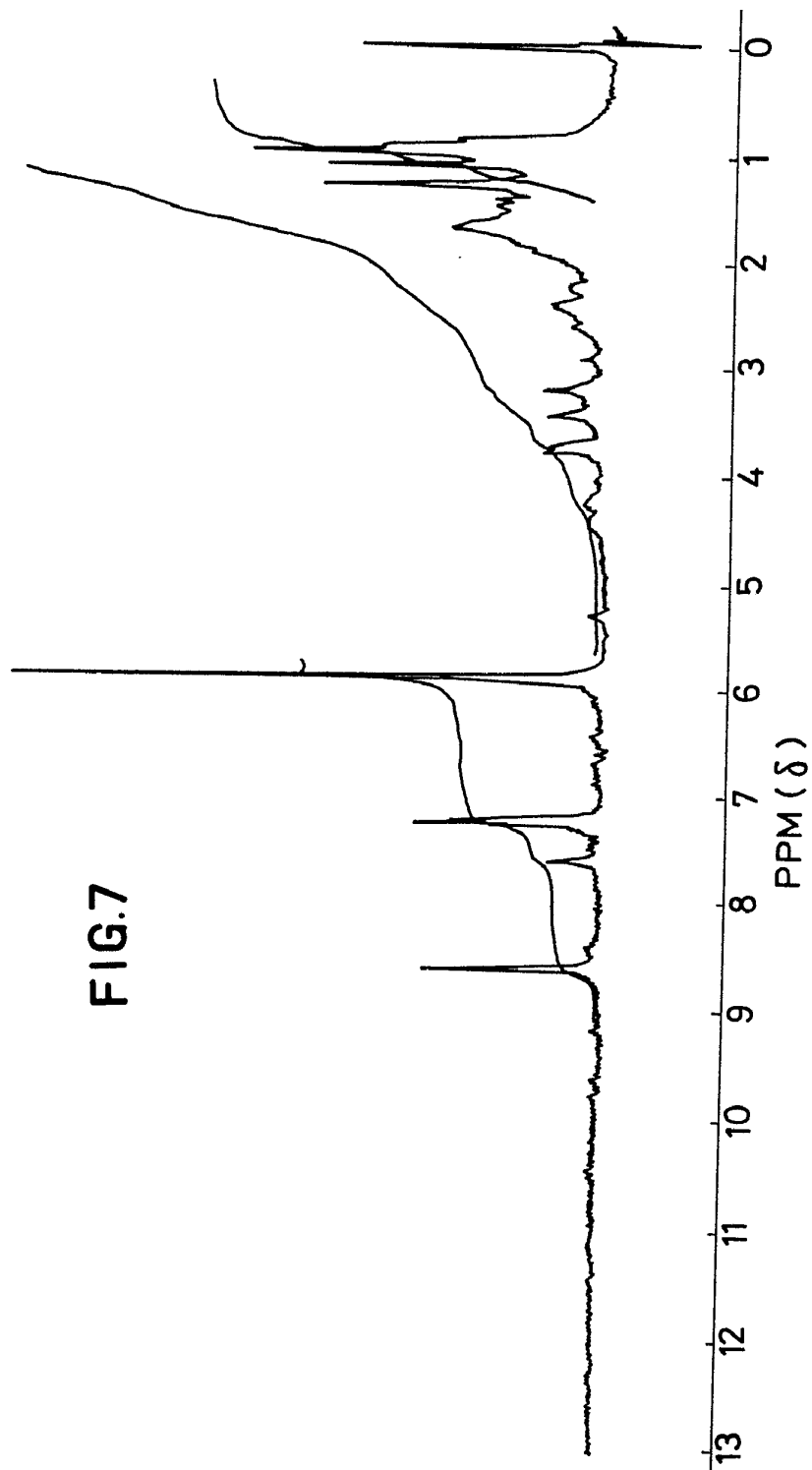
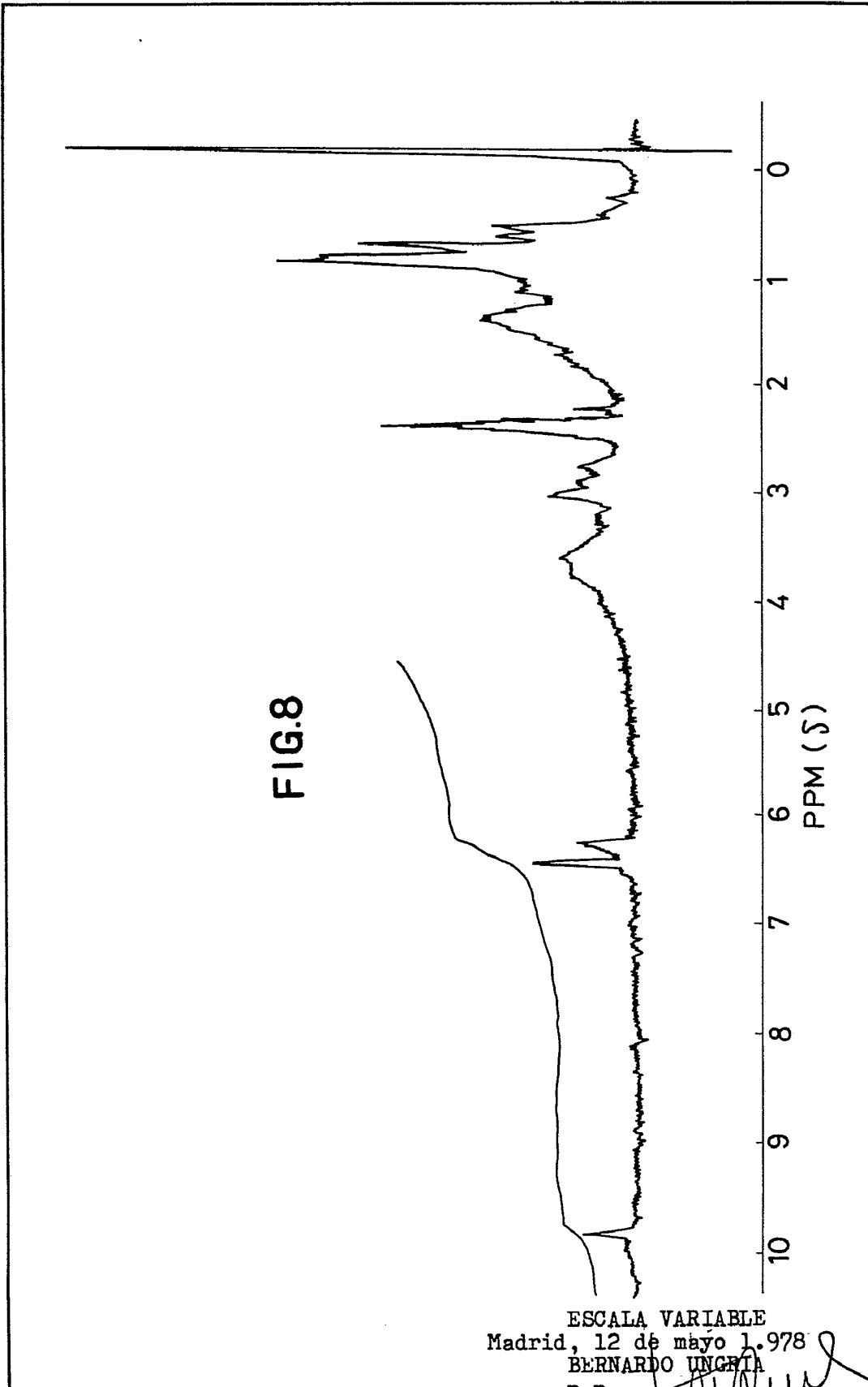


FIG.7

ESCALA VARIABLE
Madrid, 12 de mayo 1.978
BERNARDO UNGRIA
P.P.



ESCALA VARIABLE
Madrid, 12 de mayo 1.978
BERNARDO UNGRIA
P.P.

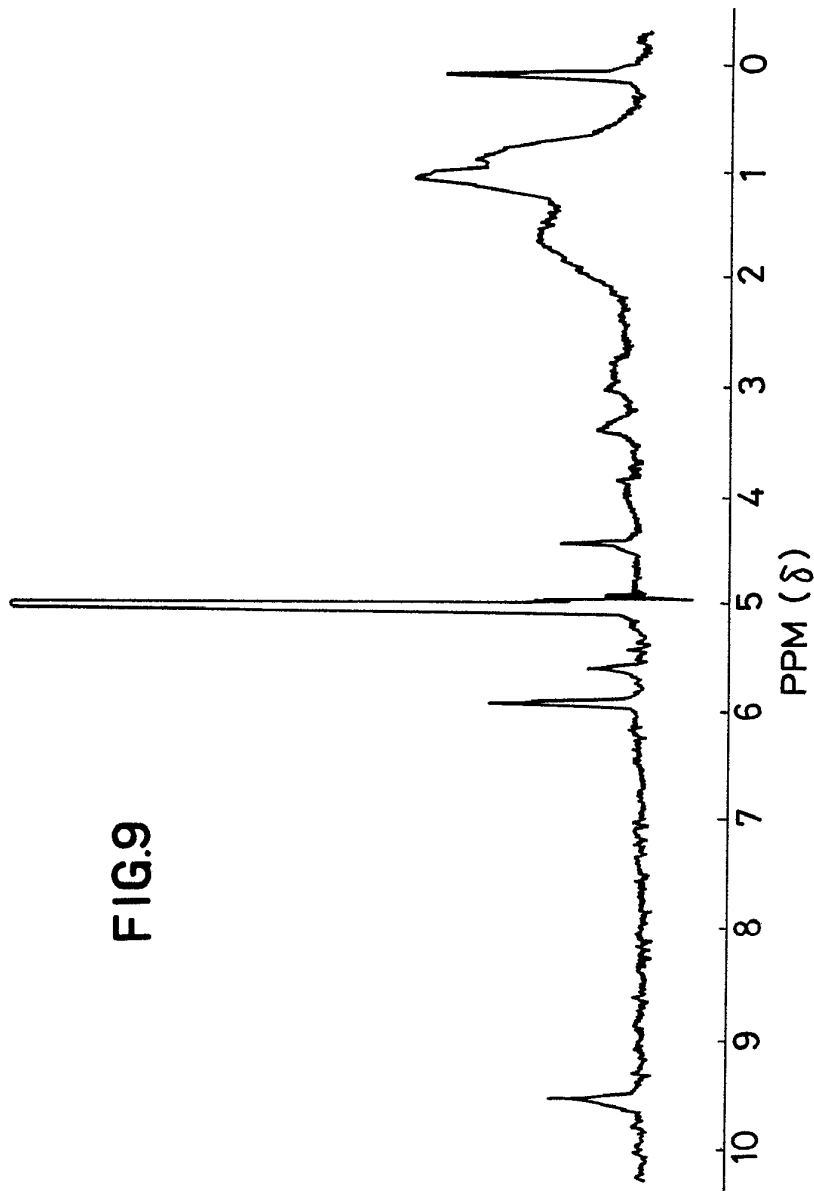


FIG.9

ESCALA VARIABLE
Madrid, 12 de mayo 1.978
BERNARDO UNGRIA
P.P.