

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA  
 Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

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

**PATENTE DE INVENCION**

(16) ES (17) (21) (22)	NUMERO 478.874	(18) A1
	FECHA DE PRESENTACION 22 MARZO 1979	

(1) NUMERO DE REGISTRO 30536/78	(2) FECHA 31 Marzo 1978	(3) PAIS Japón
(4) CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D 13/04; A61K 31/71	(5) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA - - -	
(6) TITULO DE LA INVENCION "Procedimiento de preparar 3-O-(beta-D-glucuronopiranosil)-sojasa pogenol B"		
(7) APLICANTE(S) OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.		
(8) DOMICILIO DEL SOLICITANTE No. 2-9, Kandatsukawa-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japón		
(9) REPRESENTANTE(S) Masahiro Shinohara, Yoshimasa Nakano, Hirotsugu Kaise, Taketomi Izawa y Wasei Miyazaki		
(10) ABOGADO  		
(11) ABOGADO M. Aurell Junol		

EX-1120  
 EX-JA-II

UTILÍZSE COMO PRIMERA PAGINA DE LA MEMORIA

**POOR  
 QUALITY**

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

por VEINTE años

5. solicitada en España a favor de OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., de nacionalidad japonesa, domiciliada en No. 2-9, Kandatsukasa-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japón, por "Procedimiento de preparar 3-O-(beta-D-glucuronopiranosil)-sojasapogenol B", con prioridad de la solicitud japonesa 38536/78 de fecha 31 Marzo 1978. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

10.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

15. Esta invención se refiere, de manera general, a nuevos compuestos, el 3-O-(beta-D-glucuronopiranosil)-sojasapogenol B y a sus sales y, en su aspecto reivindicado, a un procedimiento para prepararlos. - - - - -

Los compuestos a los que, de manera general, se refiere esta invención tienen actividad anticomplementaria y son útiles como agentes terapéuticos para las enfermedades de autoinmunidad, las enfermedades del colágeno y las enfermeda-

des reumáticas. - - - - -

Descripción de la técnica anterior

- Se conocen varios compuestos relacionados con los compuestos a los que, de manera general, se refiere esta invención. Por ejemplo, se conocen la glicirricina [Yasuhiro Ariga, Hiroyuki Sumi, Yumiko Takada y Akikazu Takada, Abridgements of Lecture Programs on Seminar of the Plasmin Research Association, página 65 (1977); Koretsugu Arimoto, Kaneyuki Mineta, Hiroyuki Sumi, Yumiko Takada y Akikazu Takada, Proceedings of the 14th Symposium on Complements, p. 79-82 (1977)] y el 3-0-(6-0-metil-beta-D-glucuronopiranosil)-sojasapogenol B [Isao Kitagawa, Masayuki Yoshikawa e Ichiro Yoshioka, Chem. Pharm. Bull., 22, p. 1339 (1974); Ibid., 24, p. 121 (1976)], etc. El primero de estos compuestos tiene una estructura a modo de esteroide y presenta una actividad similar a la de los esteroides. Por ejemplo, presenta una actividad inhibidora contra la plasmina, la urocinasa, la calicreína, la trombina y los complementos. Por el contrario, aún no se han señalado las actividades fisiológicas del segundo. En contraposición con ello, los compuestos a los que, de manera general, se refiere esta invención y sus sales tienen una actividad anticomplementaria que es inesperadamente superior a la de la glicirricina y que no puede esperarse en absoluto del 3-0-(6-0-metil-beta-D-glucuronopiranosil)-sojasapogenol B como resultará evidente de los resultados de los ensayos farmacológicos descritos posteriormente. - - - - -
- 5.
  - 10.
  - 15.
  - 20.
  - 25.

SUMARIO DE LA INVENCION

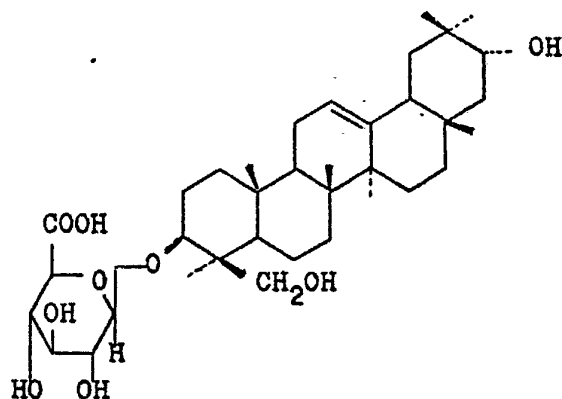
Un objetivo de esta invención es proporcionar un nuevo derivado sojasapogenol y sus sales que tienen actividad anticomplementaria. - - - - -

5. Otro objetivo de esta invención es proporcionar un procedimiento para preparar un derivado sojasapogenol y sus sales que tienen una alta actividad anticomplementaria. - -

10. Aún otro objetivo de esta invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden un derivado sojasapogenol de la fórmula (I) o sus sales. - - - - -

Aún otro objetivo de esta invención es proporcionar un procedimiento para tratar nefritis utilizando tal derivado sojasapogenol o sus sales. - - - - -

15. Esta invención proporciona un nuevo derivado sojasapogenol expresado por la siguiente fórmula (I): - - - - -



Esta invención proporciona también sales farmacéu-  
ticamente aceptables del derivado sojasapogenol de la ante-  
rior fórmula (I) que se obtienen haciendo reaccionar el deri-  
vado sojasapogenol con compuestos básicos apropiados. - - -

5. Esta invención proporciona también (y en ello radi-  
ca su objeto reivindicado) un procedimiento para la produc-  
ción del derivado sojasapogenol de la anterior fórmula (I),  
como se describe posteriormente en detalle. - - - - -

10. Esta invención proporciona también composiciones  
farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente efi-  
caz del derivado sojasapogenol de la anterior fórmula (I) o  
sus sales farmacéuticamente aceptables, para lograr una acti-  
vidad anticomplementaria en animales, y un método de utiliza-  
ción, particularmente de tratamiento de enfermedades nefríti-  
cas en animales, que comprende administrar la composición  
15. farmacéutica a un paciente afectado por tal enfermedad. - -

BREVE DESCRIPCION DE LOS PLANOS

La Figura 1 es una microfotografía del Stachybotrys  
sp. T-791. - - - - -

20. DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Los compuestos a los que, de manera general, se re-  
fiere la presente invención pueden utilizarse para aliviar o  
prevenir las reacciones patológicas que requieren la actuación

de un complemento y en el tratamiento terapéutico de las enfermedades inmunológicas tales como artritis reumatoide, lupus erythematosus sistémico, glomerulonefritis, anemia hemolítica autoalérgica, enfermedades de las plaquetas, vasculitis, etc.

5. Dichos compuestos pueden también utilizarse en el tratamiento terapéutico de enfermedades no inmunológicas tales como hemoglobinuria nocturna paroxiamal, edema angionéurico hereditario y estados inflamatorios provocados por la acción de enzimas bacterianas o lisosomáticas sobre los componentes de complemento apropiados como, por ejemplo, la inflamación que sigue a la oclusión de las coronarias. También pueden ser útiles en el tratamiento de rechazos de trasplantes y como medios de cultivo y de transporte de sangre. - - - - -
- 10.

En los últimos años se ha investigado mucho el análisis teórico del sistema de complementos y de sus efectos en el hombre y los animales y actualmente se reconoce, de manera general, que cuando ciertos compuestos tienen una actividad anticomplementaria pueden presentar efectos terapéuticos sobre varios de los síntomas descritos anteriormente.

15. Por ejemplo, la patente US 4.021.544 dice lo siguiente: - -
- 20.

"La expresión 'complemento' designa un grupo complejo de proteínas de los fluidos corporales que, actuando conjuntamente con anticuerpos u otros factores, juegan una importante función como mediadores de las reacciones de inmunidad, alérgicas, inmunoquímicas y/o inmunopatológicas. Las reacciones en las que participa un complemento tienen lugar

- 25.

en el suero de la sangre o en otros fluidos corporales y por lo tanto son consideradas como reacciones humorales". - - -

- "Con respecto a la sangre humana, existen actualmen
5. te más de 11 proteínas en el sistema de complementos. Estas proteínas de complementos se designan por medio de la letra C y de número: C1, C2, C3 y así sucesivamente hasta C9. La proteína de complemento C1 es actualmente un conjunto de subunidades designadas por C1q, C1r y C1s. Los números asignados a las proteínas de complementos reflejan la secuencia en la
10. que resultan activas, con la excepción de la proteína C4 de complementos que reacciona después de la C1 y antes de la C2. Las asignaciones numéricas de las proteínas del sistema de complementos se hicieron antes de que se comprendiera total
15. mente la secuencia de reacciones. Una exposición más detallada del sistema de complementos y de su función en los procesos del cuerpo puede hallarse, por ejemplo, en Bull. World Health Org., 39, 935-938 (1968), Scientific American, 229, (No. 5), 54-66 (1973), Medical World News, 11 Octubre 1974, pp. 53-58, 64-66, Harvey Lectures, 66, 75-104 (1972), The
20. New England Journal of Medicine, 287, 489-495, 545-549, 592-596, 642-646 (1972), The John Hopkins Med. J., 128, 57-74 (1971) y Federation Proceeding, 32, 134-137 (1973)". - - -

- "Puede considerarse que el sistema de complementos está compuesto por tres subsistemas: (1) una unidad (C1q) de
25. reconocimiento que le permite combinarse con moléculas de an

- ticuerpos que han detectado un invasor extraño; (2) una unidad (C1r, C1s, C2, C4, C3) de activación que prepara un lugar en la membrana adyacente; y (3) una unidad (C5, C6, C7, C8 y C9) de ataque que crea un orificio en la membrana. La
5. unidad de ataque de la membrana es no específica; destruye a los invasores sólo debido a que se genera en su proximidad. A fin de minimizar el peligro respecto a las células propias del anfitrión, su actividad debe estar limitada en el tiempo. Esta limitación se logra, parcialmente, por el decaimiento
10. espontáneo del complemento activado y, parcialmente, por la interferencia de los inhibidores y las enzimas destructivas. El control de los complementos, sin embargo, no es perfecto y en algunas ocasiones se dañan las células del anfitrión. Por ello la inmunidad es una espada de doble filo". - - - -
15. "La activación del sistema de complementos acelera también la formación de coágulos sanguíneos. Esta acción tiebe lugar por medio de la liberación interpuesta de complementos de un factor de formación de coágulos de las plaquetas. El fragmento y los complejos de complementos biológicamente
20. activos pueden quedar implicados en reacciones que perjudican las células del anfitrión y estas reacciones patógenas pueden originar el desarrollo de enfermedades inmunocomplejas. Por ejemplo, en algunas formas de nefritis, el complemento daña la membrana básica del riñón, originando que esca
25. pen proteínas desde la sangre a la orina. La enfermedad lupus erythematosus diseminado pertenece a esta categoría; sus
-

síntomas incluyen nefritis, lesiones viscerales y erupciones de la piel. El tratamiento de la difteria o del tétanos mediante la inyección de grandes cantidades de antitoxinas origina frecuentemente desórdenes del suero, que constituyen una enfermedad inmunocompleja. La artritis reumatoide implica también inmunocomplejos. Igual que el erythematosus lupus diseminado, es una enfermedad de autoinmunidad en que los síntomas de la enfermedad están causados por efectos patológicos del sistema de inmunidad en los tejidos del anfitrión.

5. En resumen, el sistema de complementos ha demostrado hallarse relacionado con las reacciones de inflamación, de formación de coágulos, de fibrinólisis, de anticuerpos-antígenos y con otros procesos metabólicos". - - - - -

10.

"En presencia de complejos anticuerpos-antígenos, las proteínas de complemento se hallan implicadas en una serie de reacciones que pueden conducir a daños irreversibles de las membranas, si tienen lugar en la proximidad de las membranas biológicas. Así, si bien el complemento constituye parte del mecanismo de defensa del cuerpo contra la infección, origina también inflamación y daño de los tejidos en el proceso inmunopatológico. La naturaleza de algunas de las proteínas de complemento, ciertas sugerencias con respecto al modo de relacionar el complemento con las membranas biológicas y la manera en que el complemento afecta al daño de las membranas se revelan en Annual Review in Biochemistry, 38, 389 (1969)". - - - - -

15.

20.

25.

"Se ha señalado que los inhibidores conocidos de complementos, el ácido épsilon-aminocaproico, el sodio suramínico y el ácido tranexámico, se han utilizado con éxito en el tratamiento del edema angionéurico hereditario, estado patológico que tiene su origen en una deficiencia inherente o en una falta de funcionamiento del inhibidor del suero del primer componente activado del complemento (inhibidor C1)

The New England Journal of Medicine, 286, 808-812 (1972); Allergol; Et. Immunipath; II, 163-168 (1974); J. Allergy Clin. Immunol, 53, No. 5, 298-302 (1974); y Annals of Internal Medicine, 84, 580-593 (1976)7". - - - - -

5.

10.

El 3-O-(beta-D-glucuronopiranosil)-sojasapogenol B obtenido según esta invención presenta una potente actividad anticomplementaria. Por ello, se espera que dicho compuesto inhiba la activación excesiva del complemento en enfermedades tales como las denominadas "enfermedades inmunocomplejas" o "enfermedades de autoinmunidad", por ejemplo nefritis, enfermedades reumáticas, lupus erythematosus sistémico, etc., y que sea eficaz en la profilaxis y la terapia de tales enfermedades. - - - - -

15.

20.

Los compuestos a los que, de manera general, se refiere esta invención pueden prepararse de varias maneras. -

Por ejemplo, el compuesto en cuestión, representado por la fórmula (I), puede aislarse y purificarse con

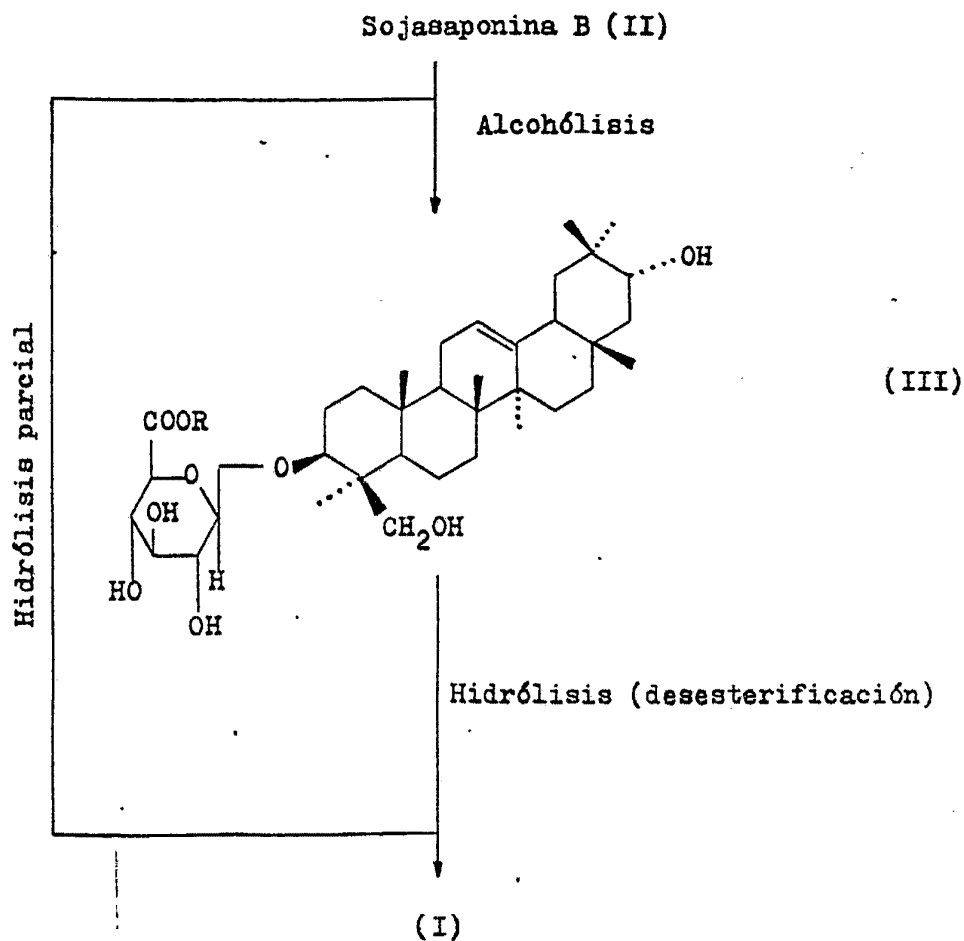
facilidad sometiendo materias vegetales conocidas, que contienen saponina, tales como semilla de soja, que contiene compuestos que tienen una porción 3-O-(beta-D-glucuronopiranosil)-sojasapogenol como estructura parcial, a tratamientos químicos, opcionalmente de forma conjunta con tratamientos físicos. Por ejemplo, el compuesto representado por la fórmula (I) puede prepararse separando primero sojasaponina B de las semillas de soja y tratando entonces este compuesto según el esquema 1 de reacción descrito posteriormente. - - - - -

10. La separación de la sojasaponina B puede realizarse utilizando procesos y medios de separación conocidos. Los ejemplos de los tratamientos químicos adecuados incluyen hidrólisis, alcoholólisis, esterificación, acilación, etc. Los ejemplos de los tratamientos físicos adecuados incluyen extracción con disolventes, dilución con disolventes, cromatografía de líquidos, cromatografía de gases, recristalización, etc. - - - - -

Más específicamente, el compuesto representado por la fórmula (I) puede prepararse sometiendo sojasaponina B (II) obtenida según el procedimiento de Kitagawa et al [Isao Kitagawa, Masayuki Yoshikawa e Ichiro Yoshioka, Chem. Pharm. Bull., 22, p. 1339 (1974), Ibid., 24, p. 121 (1976)] a alcoholólisis con un alcohol inferior tal como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, pentanol, hexanol, etc., en presencia de un ácido para formar 3-O-(6-O-alkil-beta-D-

5. glucuronopiranosil)-sojasapogenol B [fórmula (III)] e hidrolizándolo entonces (esquema 1 de reacción). La expresión "sojasaponina B", tal como se utiliza aquí, designa una mezcla de sojasaponinas I, II y III que contienen sojasapogenol B como aglicón, como se describe en las referencias de la literatura mencionadas anteriormente. - - - - -

Esquema 1 de reacción



En la anterior fórmula (III), R representa un grupo alquilo inferior que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. -

5. En la alcoholólisis de la sojasaponina B (II) pueden utilizarse varios ácidos empleados convencionalmente en la alcoholólisis. Los ejemplos adecuados de tales ácidos incluyen haluros de hidrógeno, tales como cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, etc., ácidos inorgánicos fuertes, tales como ácido sulfúrico, ácido nítrico, etc., ácidos orgánicos fuertes, tales como ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, etc., ácidos de Lewis, tales como cloruro de 10. aluminio, trifluoruro de boro, tetracloruro de titanio, tetrabromuro de titanio, etc. - - - - -

15. La alcoholólisis puede realizarse preferentemente entre la temperatura ambiente y los 150°C y, más preferentemente, a unos 50-100°C, durante unas 1-6 horas. - - - - -

20. El método de aislamiento de los compuestos representados por la fórmula (III) respecto a la mezcla de reacción no está particularmente limitado y pueden emplearse varios métodos conocidos que utilizan las propiedades físico-químicas de las sustancias producidas incluyendo los empleados en la separación de sojasaponina B. Los ejemplos adecuados de tales métodos incluyen un método que utiliza las diferencias de solubilidad entre los productos y las impurezas, un método que utiliza las diferencias de poder de adsorción 25. y de afinidad respecto a los adsorbentes ordinarios, tales

como carbón activado, XAD-2, gel de sílice, resinas de intercambio iónico, Sephadex, etc., un método que utiliza las diferencias de coeficiente de distribución entre dos fases líquidas y una combinación de tales métodos. Por ejemplo, el alcoholizado se mezcla con agua para formar precipitados que se someten a cromatografía en gel de sílice y se eluyen paso a paso con un eluyente, por ejemplo una mezcla de cloroformo y etanol, para aislar el compuesto de la fórmula (I). - -

10. La hidrólisis del compuesto representado por la fórmula (III) puede realizarse usualmente en un disolvente inerte en presencia de un catalizador bajo las condiciones empleadas convencionalmente en la hidrólisis de los ésteres. En esta reacción pueden utilizarse catalizadores convencionales. Los ejemplos adecuados de los catalizadores que pueden utilizarse incluyen ácidos minerales tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, etc. y compuestos básicos inorgánicos, tales como hidróxido sódico, hidróxido potásico, carbonato sódico, bicarbonato sódico, carbonato potásico, bicarbonato potásico, etc. Como catalizador se prefieren los compuestos inorgánicos básicos. - - - - -

25. En la anterior reacción pueden utilizarse cualesquiera disolventes inertes convencionales. Los ejemplos adecuados de disolventes inertes incluyen agua, alcoholes inferiores tales como metanol, etanol, propanol, etc., éteres tales como dioxano, tetrahydrofurano, etc., sulfóxido de dimetilo, dimetilformamida, etc., o una mezcla de los mismos. La

reacción de hidrólisis puede realizarse preferentemente a una temperatura desde la ambiente a 150°C y, más preferentemente, de 50 a 110°C, durante unas 1-6 horas. - - - - -

5. El compuesto representado por la fórmula (I) puede aislarse de los productos de hidrólisis parcial de la sojasa ponina B (II) en que se realiza la hidrólisis en agua o una mezcla de agua y uno o más de los disolventes anteriormente descritos, en presencia de haluros de hidrógeno, tales como cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, etc., ácidos inorgánicos fuertes tales como ácido sulfúrico, ácido nítrico, etc., o ácidos orgánicos fuertes tales como ácido tricloroacético, ácido trifluoacético, etc. La expresión "hidrólisis parcial" utilizada aquí designa hidrólisis en la que no tiene lugar escisión del aglicón del material de partida, es decir la saponina B. - - - - -
- 10.
- 15.

20. El aislamiento del compuesto al que, de manera general, se refiere esta invención respecto al hidrolizado parcial puede realizarse utilizando los métodos anteriormente descritos de aislamiento. Por ejemplo, después de extraerlo con n-butanol para eliminar los componentes solubles en agua, el hidrolizado parcial se somete a cromatografía en columna de gel de sílice para separarlo en respectivos componentes y la fracción correspondiente al 3-O-(beta-D-glucuronopiranosil)-sojasapogenol B se somete a cristalización a partir de un disolvente adecuado, por ejemplo una mezcla de cloroformo y acetona (1:1 en volumen). La hidrólisis parcial puede rea-
- 25.

lizarse usualmente a una temperatura desde la ambiente a 150°C, preferentemente de 50 a 110°C, durante unas 1-6 horas. - - - - -

5. Alternativamente, el compuesto representado por la fórmula (I) puede prepararse utilizando microorganismos aislados por primera vez por los inventores de la presente. - -

A continuación se darán más detalles de dichos microorganismos. - - - - -

I. Lugar en que se encuentra

10. Esta cepa se aisló del suelo de la ciudad de Tokushima, Tokushima, Japón. - - - - -

II. Características en varios medios de cultivo

15. Las características de cultivo de esta cepa en varios medios, basándose en observaciones visuales y microscópicas (Figura 1) son como sigue: - - - - -

Observación visual

1) Medio de extracto de malta agar

El crecimiento es rápido e irregular. El color de

la superficie posterior de la colonia es desde canela (Tan, 3ie) a marrón oscuro (Dk Brown, 3pn). La colonia es plana y la formación de conidios es buena. El color de las hifas es desde bizcocho (Biscuit, 2ec) a canela (Tan, 3ie) y se observan pequeñas gotas de líquido que exudan. No se produce pigmento soluble. - - - - -

5.

2) Medio de glucosa de patata

El crecimiento es muy rápido y por cultivo a 27°C, durante 30 días, el tamaño de la colonia alcanza 70 mm. La parte periférica de la colonia se esparce dendríticamente y se observan hifas blancas adheridas. Hay presente un gran número de gotas de líquido. Casi no se observa formación de esporas. El color de la superficie posterior de la colonia es ambar claro (Lt Ambar, 3ie). No se forma pigmento soluble. -

10.

3) Medio Czapek's Dox agar

15.

El crecimiento es bajo.

4) Medio de mucosidad sintética agar

El crecimiento es bajo.

5) Medio de harina de avena agar

El crecimiento es muy bueno, de modo que en dos semanas el plato Petri queda cubierto. La colonia es delgada

20.

- y plana. La formación de hifas es abundante desde la etapa inicial del cultivo y la formación de conidios es también rápida. El color de la colonia pasa del blanco al marrón obscuro (Dk Brown, 3pn) a medida que avanza el cultivo. En las
5. hifas se producen grandes cantidades de gotas de líquido. No se produce pigmento soluble. - - - - -

### III. Propiedades morfológicas

- De la Figura 1 puede verse lo siguiente: los fialóforos simplemente se ramifican y permanecen erectos. Las pun
10. tas de los fialóforos se comban ligeramente en forma de barra. Sin embargo, la combadura no es tan grande como la que se ob
15. serva en las cepas del tipo Stachybotrys echinata IFO 7525 y 8856. Esta cepa presenta una anchura de hifas de 4,0 a 4,5  $\mu$ , ligeramente mayor que el fialóforo. Los fialóforos que quedan ramificados y erectos con las células de los pies de las hifas vegetativas o de las hifas aéreas tienen de 2 a 3 septos y tienen un tamaño de 40-80 x 3,0-3,5  $\mu$ . La pared celular del fialóforo no es equinulada, sino lisa. - - - - -

- En las puntas de los fialóforos se forman de tres
20. a seis fialidas a partir de la porción combada. Además, se forman fialosporas de esféricas a subglobosas de una célula con una protuberancia equinulada y un tamaño de 4,3-5,2 x 3,0-4,2  $\mu$  continuamente y de forma basipétala en las puntas de la fialida y una cadena de 24 a 70 conidios. La fialida

tiene una forma de obclavato y tiene un tamaño de 6,9-10,7 x 3,5-4,7  $\mu$ . Los fialóforos y la fialida son incoloros y la fialida tiene un color desde café (Coffee, 3pn) a negro. - -

5. La caracterización taxonómica de la presente cepa que tiene las anteriores propiedades microbiológicas ha sido investigada por medio de los trabajos de G.L. Barron, The Genera of Hypnomyces from Soil, The Williams & Wilkins Company, Baltimore (1968), 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. Greiner 3301 Lehre (1970). Según el sistema taxonómico de Saccardo, la presente cepa pertenece a la clase Hyphomyces, familia Dematiaceae, género Stachybotrys. En otras palabras, las propiedades de la presente cepa, caracterizada por
10. la ausencia de ascocarpos y de otros órganos reproductivos sexuales, la formación de fialosforos de color marrón oscuro a partir de la fialida y la acumulación de las fialosforas resultantes en forma semicircular en los extremos superiores de la fialida concuerdan perfectamente con las propiedades del género Stachybotrys. - - - - -
- 15.
- 20.

25. Las distintas características de la presente cepa se han identificado con referencia a los manuales anteriormente descritos de investigación y a las referencias de la literatura tales como G.R. Bisby, Trans. Brit. Mycol. Soc., 26, 133-143 (1943), R.K. Zuck, Mycologia, 38, 69-76 (1946),

G.L. Barron, Can. J. Bot., 39, 153-157 (1961) y en comparación con las cepas tipo que se conservan en el Instituto de la Fermentación, Osaka, Japón (IFO). - - - - -

5. Como resultado de ello, se halló que la presente cepa pertenecía al género Stachybotrys (género Memmoniella). Específicamente, la presente cepa no posee ascocarpos ni otros órganos reproductivos sexuales y se forman continuamente, de la fialida, fialosporas de color marrón oscuro. Se forman continuamente largas cadenas de esporas. Las propiedades de la presente cepa T-791 concuerdan con las del género Stachybotrys (género Memmoniella).
- 10.

15. Las distintas propiedades de la presente cepa han sido investigadas por medio de los mencionados manuales de investigación y de las mencionadas referencias de la literatura, tales como R.K. Zuck, Mycologia, 38, 69-76 (1946) y G. Smith, Trans. Brit. Mycol. Soc., 45, 387-394 (1962), y se han comparado con las cepas tipo conservadas en el IFO. Como resultado de ello se ha juzgado que, dado que se forman continuamente y basipétalmente, fialosporas a partir de fialida, la
20. cepa T-791 pertenece a Memmoniella echinata a la que Höhnelt le dió nombre. Sin embargo, de los citados trabajos de R.K. Zuck y G. Smith, se consideró que la presente cepa T-791 era una cepa análoga al Stachybotrys echinata. Por lo tanto, se comparó con la Stachybotrys echinata IFO 7525 e IFO 8856. -

25. Morfológicamente, no se observaron protuberancias

- equinuladas específicas a las cepas de los dos tipos en las paredes celulares de los fialóforos de la presente cepa T-791. Además, en las cepas tipo las puntas de los fialóforos se comban a 2-3 veces la anchura de las hifas de los fialóforos; sin embargo no se observa combado notorio en la presente cepa. Además, las cepas de los dos tipos presentan buen crecimiento en varios medios de cultivo, especialmente en medio de glucosa de patata agar, forman colonias circulares algo levantadas y las hifas se adhieren abundantemente.
- 5.
10. Además, se observa una conspicua formación de conidios. En contraposición con ello, la presente cepa presenta un crecimiento irregular dendrítico, como se ha indicado anteriormente, y se observa una mala formación de hifas y una mala formación de conidios. De las anteriores diferencias microbiológicas se ha considerado que la presente cepa es una cepa nueva y se ha denominado Stachybotrys sp. T-791. - - - - -
- 15.

La indicación de los colores anteriores y posteriores se realiza según el método descrito en Color Harmony Manual, Container Corporation of America (1958). - - - - -

20. IV. Propiedades fisiológicas

La Stachybotrys sp. T-791 es una cepa aerobia y tiene las siguientes propiedades fisiológicas: - - - - -

Stachybotrys sp. T-791

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

5. Se han depositado muestras de la nueva cepa, Stachybotrys sp. T-791 en el Instituto de Investigación de la Fermentación, Departamento de Ciencia y Tecnología Industrial, Japón (nº 8-1, Inage Igashi 5-chome, Chiba-shi, Chiba, Japón) bajo el número de depósito FERM-P 3803 y han sido también depositadas en la American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland, U.S.A. 20852) bajo el número de depósito ATCC 20513. - - - - -

10. Específicamente, la preparación del compuesto al que, de manera general, se refiere esta invención por medio del microorganismo del género Stachybotrys descrito anteriormente se logra de la siguiente manera: - - - - -

15. Primero los microorganismos se cultivan en un medio que contiene fuentes y aditivos nutrientes ordinarios. Las fuentes de nitrógeno utilizadas generalmente como substrato de cultivo incluyen, por ejemplo, polvo de semilla de soja, aceite de semilla de soja, líquido de remojado de maíz, extracto de levadura, levadura seca, harina de avena, extracto de carne, caseína hidrolizada, sales amónicas y sales nitrato. Los ejemplos de fuentes de carbono adecuadas son glucosa, glicerol, maltosa, almidón, lactosa, sucrosa y melazas. Los

20.

25.

- ejemplos de aditivos para el medio de cultivo incluyen sales inorgánicas tales como carbonato cálcico, cloruro sódico, sulfato magnésico y ácido fosfórico. Si se requiere, el medio de cultivo puede contener además pequeñas cantidades de sales de metales tales como hierro, cobre, manganeso y zinc.
5. El cultivo puede realizarse en un medio acuoso ordinario que contenga el anterior substrato, utilizando una técnica de cultivo superficial o una técnica de cultivo sumergido con aireación y agitación. Se prefiere el cultivo sumergido con aireación y agitación. El cultivo puede realizarse ventajosamente a una temperatura de 15 a 38°C, preferentemente de 20 a 32°C, durante un período de usualmente 3 a 7 días, bajo condiciones ordinarias de aireación, mientras se mantiene el pH del medio de cultivo a 3,5-11,5, preferentemente a 4,5-9,5. - - - - -
- 10.
- 15.

- Después del cultivo, la substancia producida se recupera del caldo de cultivo. El método de recuperación no está particularmente limitado y pueden emplearse varios métodos conocidos que utilizan las propiedades fisicoquímicas de las substancias producidas. La recuperación puede lograrse, por ejemplo, por medio de un método que utiliza las diferencias de solubilidad entre los productos y las impurezas, de un método que utiliza las diferencias de poder de adsorción y de afinidad respecto a los adsorbentes ordinarios, tales como carbón activado, XAD-2, gel de sílice, resinas de intercambio iónico, Sephadex, etc., de un método que utiliza las
- 20.
- 25.

diferencias del coeficiente de distribución entre dos fases líquidas y de una combinación de tales métodos. - - - - -

5. El compuesto así preparado puede formar sales con varios compuestos básicos farmacéuticamente aceptables. Desde luego, esta invención incluye estas sales dentro de su alcance. - - - - -

10. Los ejemplos adecuados de los compuestos básicos que pueden utilizarse para formar las anteriores sales incluyen compuestos básicos inorgánicos, por ejemplo hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido de aluminio, carbonato sódico, carbonato potásico, bicarbonato sódico, etc., y compuestos orgánicos básicos, por ejemplo piperacina, morfolina, piperidina, etilamina, dimetilamina, trietilamina, etc.

15. Los compuestos a los que, de manera general, se refiere esta invención pueden utilizarse como agentes de tratamiento de las nefritis y, cuando se utilizan para este fin, se formulan en forma de composiciones farmacéuticas junto con los vehículos ordinarios farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados que pueden utilizarse son, por ejemplo, diluyentes o excipientes tales como cargas, extensores, aglomerantes, agentes humectantes, desintegrantes, agentes de actividad superficial y lubricantes que se emplean usualmente para preparar tales drogas según la forma de dosificación. -

20.

Según el objetivo de la terapia pueden elegirse va

rias formas de dosificación de los agentes terapéuticos como agente de tratamiento de nefritis. Las formas típicas de dosificación que pueden utilizarse son tabletas, píldoras, polvos, preparaciones líquidas, suspensiones, emulsiones, gránulos, cápsulas, supositorios y preparaciones inyectables (disoluciones, emulsiones, suspensiones, etc.). - - - - -

En el moldeo de una composición farmacéutica que contenga los compuestos de esta invención como ingrediente activo para formar una tableta, puede utilizarse una amplia gama de vehículos conocidos en la técnica. Los ejemplos de los vehículos adecuados incluyen excipientes tales como lactosa, azúcar blanco, cloruro sódico, glucosa, urea, almidón, carbonato cálcico, caolín, celulosa cristalina y ácido silícico; aglomerantes tales como agua, etanol, propanol, jarabe simple, glucosa, disolución de almidón, disolución de gelatina, carboximetilcelulosa, shellac, metilcelulosa, fosfato potásico y polivinilpirrolidona; desintegrantes tales como almidón seco, alginato sódico, polvo de agar, polvo de laminaria, bicarbonato sódico, carbonato cálcico, Tween, laurilsulfato sódico, monoglicérido de ácido esteárico, almidón y lactosa; inhibidores de la desintegración tales como azúcar blanco, gliceriléster de ácido esteárico, manteca de cacao y aceites hidrogenados; fomentadores de la absorción tales como bases amónicas cuaternarias y laurilsulfato sódico; humectantes tales como glicerol y almidón, adsorbentes tales como almidón, lactosa, caolín, bentonita y ácido silícico coloidal;

y lubricantes tales como talco purificado, sales de ácido es  
teárico, polvo de ácido bórico, Macrogol y polietilenglicol  
sólido. - - - - -

- En el moldeo de la composición farmacéutica para
- 5. formar píldoras puede utilizarse una amplia variedad de vehí-  
culos convencionales conocidos en la técnica. Los ejemplos  
de vehículos adecuados son excipientes tales como glucosa,  
lactosa, almidón, manteca de cacao, aceites vegetales endure-  
cidos, caolín y talco, aglomerantes tales como polvo de goma
  - 10. arábica, polvo de tragacanto, gelatina y etanol y desinte-  
grantes tales como laminaria y agar. Las tabletas, si se de-  
sea, pueden recubrirse y constituirse en forma de tabletas  
recubiertas de azúcar, tabletas recubiertas de gelatina, ta-  
bletas recubiertas de entéricos, tabletas recubiertas de pe-  
lícula o tabletas recubiertas con dos o más capas. - - - - -
  - 15.

- En el moldeo de la composición farmacéutica para
- 20. formar un supositorio puede utilizarse una amplia variedad  
de vehículos conocidos en la técnica. Los ejemplos de los ve-  
hículos adecuados incluyen polietilenglicol, manteca de ca-  
cao, alcoholes superiores, ésteres de alcoholes superiores,  
gelatina, y glicéridos semisintéticos. - - - - -

Cuando la composición farmacéutica se formula para  
formar una preparación inyectable, la disolución o suspensión  
resultantes se esteriliza preferentemente y se isotoniza con

respecto a la sangre. En la formulación de la composición farmacéutica para formar una disolución o suspensión pueden utilizarse todos los diluyentes habitualmente utilizados en la técnica. Los ejemplos de los diluyentes adecuados son

5. agua, alcohol etílico, propilenglicol, alcohol isoestearílico etoxilado, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán. Pueden incorporarse cloruro sódico, glucosa o glicerol en un agente terapéutico, por ejemplo, tal como un agente de tratamiento de nefritis, en una cantidad suficiente para preparar disoluciones isotónicas. El agente terapéutico puede contener además los coadyuvantes de disolución, tampones, agentes de alivio del dolor y conservantes ordinarios y opcionalmente agentes colorantes, perfumes, esencias, edulcorantes y otras drogas. - - - - -
- 10.

15. La cantidad del compuesto al que, de manera general, se refiere esta invención a incorporar como ingrediente activo en una composición farmacéutica útil como agente de tratamiento de nefritis no está particularmente limitada y puede variar dentro de una amplia gama. Una cantidad adecuada y terapéuticamente eficaz del compuesto de esta invención es usualmente de 1 a 70% en peso y, preferentemente, de 5 a 50% en peso, en base a toda la composición. - - - - -
- 20.

25. No existe límite particular en cuanto a la manera de utilizar el agente terapéutico como agente anticomplementario, tal como agente de tratamiento de nefritis, y el agente terapéutico puede administrarse por vías adecuadas para las

formas particulares del agente terapéutico. Por ejemplo, las tabletas, píldoras, preparaciones líquidas, suspensiones, emulsiones, gránulos y cápsulas se administran oralmente.

Las preparaciones inyectables se administran intravenosamente, ya sea solas o conjuntamente con agentes auxiliares ordinarios, tales como glucosa y aminoácidos. Además, si se requiere, el agente terapéutico puede administrarse intramuscularmente, intracutáneamente, subcutáneamente o intraperitonealmente. Los supositorios se administran intrarrectalmente.

5. La dosificación del agente de tratamiento de la nefritis se elige adecuadamente según el objetivo del uso, los síntomas, etc. Usualmente la dosis del compuesto al que, de manera general, se refiere esta invención es de unos 0,5 a 20 mg/kg de peso corporal por día. - - - - -

10. Los compuestos a los que, de manera general, se refiere esta invención tienen actividades anticomplementarias y son también útiles como agentes terapéuticos para enfermedades de autoinmunidad, enfermedades del colágeno y enfermedades reumáticas. - - - - -

15. Los resultados de los ensayos sobre los efectos farmacológicos de dichos compuestos se indican a continuación.

Ensayos farmacológicos

1. Compuestos ensayados

A. 3-O-(beta-D-glucuronopiranosil)-sojasapogenol

---

B (invención)

B. Glicirricina (comparación)

2. Actividad anticomplementaria

Se midió la actividad anticomplementaria de los anteriores compuestos de ensayo y fue confirmada por el método de ensayo descrito en Meneki Kagaku (Immuno-Chemistry), Yuichi Yamamura et al., Ed. Asakura Shoten, Tokyo, Japón (1973) páginas 830-834. Específicamente, se cargó 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 (EA) conteniendo  $1 \times 10^8$  células/ml, 1 ml de una disolución diluida 5 veces de una disolución tampón de Veronal que contenía gelatina isotónica (esta disolución diluida 5 veces se denomina GVB<sup>++</sup> por razones de brevedad) y 0,5 ml de suero de complemento (complemento de cobaya) diluido 150 veces con el GVB<sup>++</sup>. La mezcla se mantuvo a 37°C durante 60 minutos. Entonces se le añadieron 5 ml de una disolución fisiológica salina refrigerada con hielo y la mezcla se centrifugó. Se midió la absorbancia del sobrenadante separado a OD<sub>413</sub>, y se determinó el grado en que el compuesto de ensayo inhibía la hemólisis de los eritrocitos sensibilizados. El valor de actividad inhibidora de 50% de hemólisis (gamma/ml) medido por el anterior método se indica en la siguiente Tabla 1 para cada compuesto de ensayo. - - - - -

3. Toxicidad aguda

La toxicidad aguda (DL<sub>50</sub> mg/kg) de los compuestos de ensayo se determinó en ratones por administración intraperitoneal en el caso del compuesto A y por administración intravenosa en el caso del compuesto B. - - - - -

5.

Los resultados obtenidos se indican en la siguiente Tabla 1. - - - - -

Tabla 1

<u>Compuesto de ensayo</u>	<u>Actividad anticomplementaria</u> (gamma/ml)	<u>Toxicidad aguda DL<sub>50</sub></u> (mg/kg)
A	5	Superior a 300
B	500-1.000	Superior a 300

Como resultará evidente de los resultados ilustrados en la Tabla 1 el valor de toxicidad aguda (DL<sub>50</sub>) del compuesto al que, de manera general, se refiere esta invención es de un orden que permite utilizarlo como agente terapéutico. - - - - -

10.

4. Efecto terapéutico en nefritis del tipo nefrotoxina

Se obtuvo nefrotoxina (por brevedad "NT") de rata, como se describe a continuación. - - - - -

15.

Se homogenizó córtex de riñón de rata con una cantidad igual de disolución fisiológica salina. La mezcla homoge

nizada se mezcló con coadyuvante completo de Freund (producto de Difco Company) a una relación en volumen de 1:1. Se inyectaron a un conejo (peso corporal 3.100 g) 2 ml de la mezcla resultante para inmunizarlo. Un mes y medio más tarde se extrajo sangre del corazón del conejo y se obtuvo suero. El suero resultante se desactivó a 56°C durante 30 minutos y luego se trató con una disolución acuosa saturada al 40% de sulfato amónico y se fraccionó. Se recogió la fracción gamma-globulina (IgG) para obtener NT. - - - - -

10. La evaluación terapéutica se realizó utilizando ratas macho Wistar con un peso corporal de 150 a 160 g y con tres repeticiones para cada compuesto de ensayo. El compuesto de ensayo se administró intraperitonealmente una vez cada 24 horas durante siete 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 cantidad de 1 ml en una vena de la cola de cada rata. Se utilizó disolución fisiológica salina como control. - - - - -

20. El nivel de proteinuria (cantidad total expulsada en la orina en un período de 24 horas) se midió utilizando la turbidometría y empleando albúmina de suero de bovino como control, por medio de ácido sulfosalicílico. - - - - -

Los resultados obtenidos se indican en la siguiente Tabla 2. - - - - -

TABLA 2  
Nivel de proteinuria (mg/día)

		Número de días			
		1	4	7	10
Control	1	14	17	22	32
	2	20	25	27	37
	3	12	19	20	31
	Media	15	20	23	33
Compuesto al que, de manera general, se refiere esta invención (3 mg/cuerpo)	1	1,9	1,2	0,9	7
	2	5,3	2,9	1,8	13
	3	2,5	2,7	1,1	9
	Media	3,2	2,3	1,3	9,7

El anterior número de días se cuenta desde el momento de la administración del compuesto de ensayo que se produjo 1 hora antes de la aplicación de la NT. - - - - -

5. El nivel de proteinuria en una rata sana es de 0,5 a 5 mg/día. Cuando el nivel de proteinuria sobrepasa esta gama, especialmente cuando el nivel de proteinuria es superior a 10 mg/día, puede decirse con seguridad que ha tenido lugar nefritis. Como puede verse de los resultados de la Tabla 2, la nefritis tuvo lugar en el lote de control y en el caso de

10. los compuestos a los que, de manera general, se refiere la presente invención la cantidad de proteinuria desde el momento de la administración de NT a 10 días después de la administración es substancialmente igual que en una rata sana.

Así, puede verse que la administración de dichos compuestos inhibe las reacciones de inmunidad primarias y secundarias.

5. Efectos terapéuticos en nefritis del tipo Heymann

5. En el ensayo se utilizaron ratas Wistar macho con un peso corporal de 180 a 200 g. Se extrajo córtex de riñón de rata y se homogenizó con una cantidad igual en volumen de una disolución fisiológica salina. El homogenizado se centrifugó a 1.500 G durante 1 hora. El líquido sobrenadante se purificó según el método de T.S. Edgington et al., Journal of Experimental Medicine, 127, 555 (1968), y se mezcló con coad yuvante completo de Freund 37 Ra (producto de Difco Company) a una relación en volumen de 0,4:1. La mezcla resultante se inyectó intraperitonealmente en ratas isólogas en una cantidad de 0,5 ml por rata y luego se administró la misma cantidad de mezcla cada 2 semanas hasta que el nivel de proteinuria sobrepasó los 100 mg/día (este período fue de unas 6 a 8 semanas). - - - - -

10.

15.

Cada uno de los compuestos de ensayo se administró intraperitonealmente a las ratas afectadas por la nefritis del tipo Heymann (con un peso corporal de 300 a 350 g) una vez cada día durante 7 días y luego se midió la cantidad de proteinuria (mg/día) de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Como control se utilizó disolución fisiológica salina. Los resultados obtenidos se indican en la siguiente Tabla 3. - - - - -

20.

25.

TABLA 3  
Nivel de proteinuria (mg/día)

		Número de días					
		Antes de la admi- nistración	1	4	7	14	21
Control	1	132	127	135	126	135	114
	2	121	105	121	109	103	105
	3	135	117	137	132	121	109
	Media	129	116	131	122	119	109
Compuesto al que, de manera general, se refiere esta inven- ción (3 mg/cuerpo)	1	117	89	42	27	3	8
	2	129	127	75	39	17	13
	3	123	119	58	18	9	7
	Media	123	112	58	28	3	9

5. De dos a tres semanas después del principio del en-  
sayo los pesos corporales de las ratas aumentaron de 400 a  
500 g y se consideró que los niveles normales de proteinuria  
eran de 5 a 15 mg/día. Como puede verse de los resultados de  
la Tabla 3, los compuestos a los que, de manera general, se  
refiere la presente invención pueden curar la nefritis del  
tipo Heymann. - - - - -

10. Para ilustrar la presente invención con mayor deta-  
lle se describe en los siguientes Ejemplos la producción de  
los compuestos representados por la fórmula general (I) y  
sus sales y en los siguientes Ejemplos de referencia se des-  
cribe la producción de agentes de tratamiento de nefritis que

contienen dichos compuestos de la fórmula general (I) y sus sales como ingrediente activo. - - - - -

EJEMPLO 1

5. (a) Se disolvió sojasaponina B (500 mg) en 30 ml de metanol. Después de añadir 1,5 ml de ácido sulfúrico 15 N, la disolución se reflujo durante 3,5 horas. A la mezcla de reacción se le añadió agua fría para formar precipitados que se recogieron y se lavaron suficientemente con agua. Los precipitados fueron adsorbidos en una columna de gel de sílice  
10. y revelados con una mezcla de cloroformo-etanol sucesivamente (20:1 en volumen, 200 ml; 10:1 en volumen, 150 ml; 5:1 en volumen, 200 ml; y 2:1 en volumen, 200 ml) para obtener 71 mg de 3-O-(6-metil-beta-D-glucuronopiranosil)-sojasapogenol B.

15. El compuesto así obtenido se disolvió en 2 ml de metanol y se añadieron 2 ml de una disolución acuosa de NaOH 1 N a la disolución, a lo que siguió reflujo durante 2 horas. Después de mezclar la mezcla de reacción con agua fría y de ajustar el pH a 1 con una disolución acuosa de HCl 1 N, se extrajo con n-butanol. La fracción de n-butanol se concentró  
20. hasta la sequedad bajo presión reducida. La cristalización del residuo a partir de una mezcla de cloroformo-acetona (1:1 en volumen) proporcionó 50 mg de 3-O-(beta-D-glucuronopiranosil)-sojasapogenol B. - - - - -

Punto de fusión: 231-232°C (descomposición)

25. Análisis elemental para  $C_{36}H_{58}O_9$ :

	<u>C</u>	<u>H</u>
Calculado (%):	68,11	9,21
Hallado (%):	67,85	9,08

Cromatografía en capa delgada de gel de sílice utilizando "Kiesel Gel F<sub>254</sub>" (marca de un producto de Merck Co.) - - -

5.           1. Cloroformo-metanol-agua (65 : 35 : 8 en volumen)  
              R<sub>f</sub> = 0,38
2. Isopropanol-disolución acuosa de amoníaco 2 N (100 :  
              15 en volumen) R<sub>f</sub> = 0,21

Solubilidad: Muy soluble en metanol, etanol, n-propanol, n-

10.           butanol, disolución acuosa alcalina, piridina, sulfóxido de dimetilo y dimetilformamida; soluble en acetona, acetato de etilo y metiletilcetona; y escasamente soluble en benceno, cloroformo, éter de dietilo, n-hexano y éter de petróleo. - - - - -

15.                           (b) Se disolvió sojasaponina B (500 mg) en 30 ml de etanol saturado con cloruro de hidrógeno y la disolución se refluyó durante 3 horas. Se añadió agua fría a la mezcla de reacción para formar precipitados que se recogieron y lavaron con agua. Los precipitados se purificaron entonces por
20.           medio de una cromatografía en columna de gel de sílice [solvente: cloroformo-etanol (20:1, 10:1, 5:1 y 2:1 en volumen)] para obtener 75 mg de 3-O-(6-O-etil-beta-D-glucuronopirano-

sil)-sojasapogenol B. - - - - -

El compuesto así obtenido se mezcló con 2 ml de etanol y 2 ml de una disolución acuosa de KOH 1 N y la mezcla se reflujo durante 2 horas. La mezcla de reacción se mezcló con agua fría y el valor de pH se ajustó a unos 1 con una disolución acuosa de HCl 1 N a lo que siguió extracción con n-butanol. La fracción de n-butanol se concentró hasta la sequedad bajo presión reducida y la cristalización del residuo de una mezcla de cloroformo-acetona (1:1 en volumen) proporcionó 45 mg de 3-O-(beta-D-glucuronopiranosil)-sojasapogenol B. Punto de fusión: 231-232°C (descomposición) - - - - -

EJEMPLO 2

Se disolvió sojasaponina B (1 g) en 70 ml de agua destilada y la disolución se mezcló con 5 ml de una disolución acuosa de ácido sulfúrico 15 N a lo que siguió reflujo durante 2,5 horas. La mezcla de reacción se extrajo con n-butanol. La fracción de n-butanol se concentró hasta la sequedad bajo presión reducida. El residuo fue adsorbido en una columna de gel de sílice y revelado con una mezcla de cloroformo-etanol (20:1, 10:1, 5:1 y 2:1 en volumen) para obtener 350 mg de 3-O-(beta-D-glucuronopiranosil)-sojasapogenol B. - Punto de fusión: 231-232°C (descomposición) - - - - -

EJEMPLO 3

Se cargó un matraz Sakaguchi de 500 ml con 100 ml

de un medio de cultivo que tenía la composición indicada posteriormente y se cultivó Stachybotrys sp. T-791 a 25°C y a un pH de 5,5 durante 4 días con agitación. - - - - -

5:	Glicerol	0,5%
	Almidón	1,0%
	Sucrosa	0,2%
	Polvo de semilla de soja	0,5%
	Peptona	0,1%
	Extracto de malta	0,2%
10.	MgSO <sub>4</sub>	0,3%
	HCl	0,05%

Se cargó un fermentador de jarra de 30 litros con 20 litros de un medio de cultivo de la anterior composición y se cultivó un matraz del cultivo de siembra resultante en el medio de cultivo a 28°C durante 5 días con agitación a 300 rpm y con un caudal de aireación de 1 litro por litro del medio de cultivo y por minuto. El caldo de cultivo resultante se centrifugó a una velocidad de 8.000 rpm para eliminar las células microbianas y el valor de pH del líquido sobrenadante se ajustó a unos 1 con ácido clorhídrico concentrado. Los precipitados resultantes se recogieron por centrifugación y se extrajeron con metanol. La fracción de metanol se adsorbió en una columna de carbón activado (500 ml) después de lo cual se concentró bajo presión reducida. La columna se eluyó con una disolución acuosa de acetona al 30% y luego con una disolución acuosa de acetona al 50%. La frac-

- ción de disolución acuosa de acetona al 50% se recogió y se concentró hasta la sequedad bajo presión reducida. El residuo se adsorbió en una columna de gel de sílice y se reveló utilizando una mezcla de cloroformo y acetona (2:1 y 1:1 en volumen) como eluyente. Por otra parte, se recogió y se concentró hasta la sequedad, bajo presión reducida, una fracción que contenía 3-O-(beta-D-glucuronopiranosil)-sojasapogenol B [correspondiente a la fracción que tenía un valor  $R_f$  de 0,38 que se obtuvo sometiendo "Kiesel Gel F<sub>254</sub>" (marca de un producto de Merck Co.) a cromatografía en capa delgada utilizando una mezcla de cloroformo-metanol-agua (55:35:8 en volumen) como disolución reveladora]. El concentrado se adsorbió de nuevo en una columna de gel de sílice y se reveló con una mezcla de cloroformo-acetona sucesivamente (2:1 y 1:1 en volumen) y la fracción correspondiente a la anteriormente descrita se recogió, a lo que siguió concentración hasta la sequedad. La cristalización del residuo a partir de una mezcla de cloroformo-acetona (1:1 en volumen) proporcionó 46 mg de 3-O-(beta-D-glucuronopiranosil)-sojasapogenol B.
5. Punto de fusión: 231-232°C (descomposición) - - - - -
- 10.
- 15.
- 20.

EJEMPLO 1 DE REFERENCIA

Sal sódica del compuesto al que, de manera general, se refiere esta invención	500 mg
Glucosa	250 mg
Agua destilada para la inyección	hasta constituir la cantidad total de 5 ml

5. Se disolvieron la sal sódica y la glucosa en agua destilada para la inyección y la disolución se vertió en una ampolla de 5 ml. Se purgó el aire con nitrógeno y la ampolla se calentó a 121°C durante 15 minutos para esterilizar la disolución a fin de obtener una preparación inyectable. - - -

EJEMPLO 2 DE REFERENCIA

Compuesto al que, de manera general, se refiere esta invención	750 mg
Base de glicérido semisintético	hasta constituir la cantidad total de 2.000 mg

Se añadió dicho compuesto a la base de glicérido semisintético y se mezclaron y suspendieron a 50°C. La mezcla se coló en un molde y se dejó enfriar naturalmente. El producto se eliminó y se obtuvo así un supositorio. - - - -

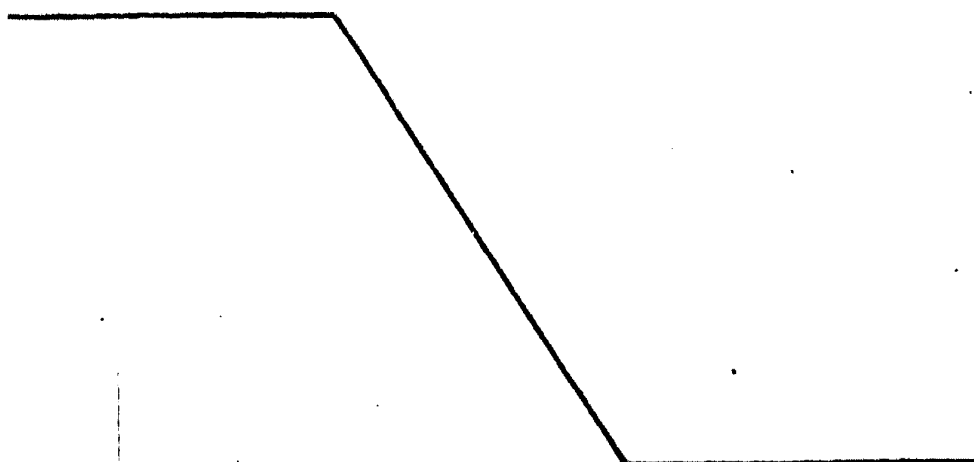
EJEMPLO 3 DE REFERENCIA

Compuesto al que, de manera general, se refiere esta invención	150 g
Avicel (marca de un producto de Asahi Kasei Kabushiki Kaisha)	40 g
Almidón de maíz	30 g
Estearato magnésico	2 g
TC-5 (marca de hidroxipropilmetilcelulosa)	10 g
Polietilenglicol	3 g
Aceite de castor	40 g
Metanol	40 g

5. El compuesto mencionado, el Avicel, el almidón de maíz y el estearato magnésico se mezclaron y se molieron y luego se dispusieron en tabletas utilizando una trituradora convencional (R 10 mm) para el recubrimiento con azúcar. Las tabletas resultantes se recubrieron con un agente de recubrimiento en película formado por TC-5, polietilenglicol 6000, aceite de castor y metanol a fin de producir tabletas recubiertas con película. - - - - -

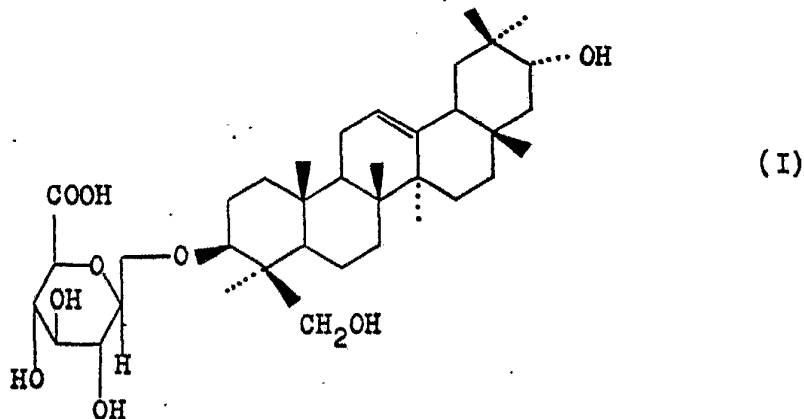
10. Si bien la invención se ha descrito en detalle y con referencia a realizaciones específicas de la misma, resultará evidente para los entendidos en la técnica que pueden introducirse varios cambios y modificaciones en ella sin salir de su espíritu y alcance. - - - - -

15. A los efectos consiguientes se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las reivindicaciones que siguen. - - - - -



REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de preparar 3-O-(beta-D-glucuronopiranosil)-sojasapogenol B y, más particularmente, de preparar un compuesto de la fórmula (I): - - - - -



5. caracterizado porque comprende cultivar aerobiamente un microorganismo del género Stachybotrys en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de nitrógeno, carbono, sales inorgánicas y minerales en trazas, a un pH de unos 3,5 a unos 11,5 y a una temperatura de unos 15° a unos 38°C, y recuperar el producto resultante de la fórmula (I) del caldo de cultivo. - - - - -
- 10.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque incluye además convertir el producto resultante en sus sales farmacéuticamente aceptables. - - - - -

3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2,  
 caracterizado porque el microorganismo es Stachybotrys sp.  
 T-791. - - - - -

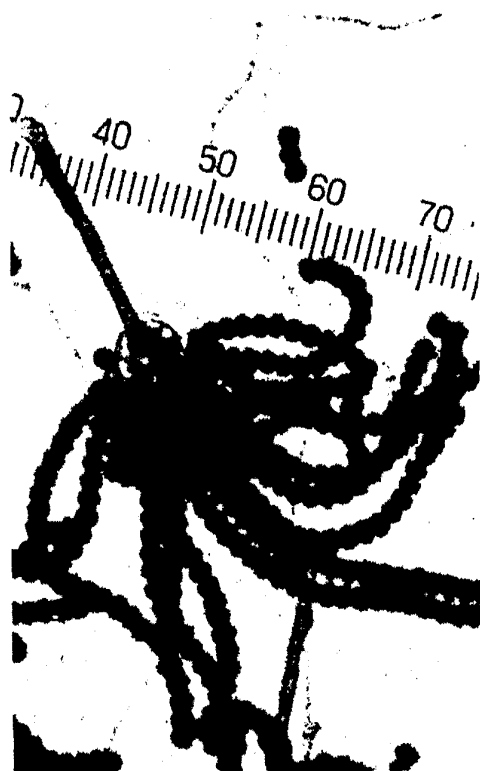
5. 4.- "PROCEDIMIENTO DE PREPARAR 3-O-(BETA-D-GLUCURO  
 NOPIRANOSIL)-SÓJASAFÓGENOL B". - - - - -

Todo ello conforme se describe y reivindica en la  
 presente memoria que consta de cuarenta y dos hojas, folia-  
 das y mecanografiadas por una sola de sus caras, y de una lá-  
 mina de dibujos que la ilustra.

MADRID, 22 MARZO 1979  
 P.A. M. CURELL SUÑOL



**POOR  
 QUALITY**



MARCEL 2 0 1 1 1 1 1 1

P.A. M. CORRE SUÍZOL

*Handwritten signature*