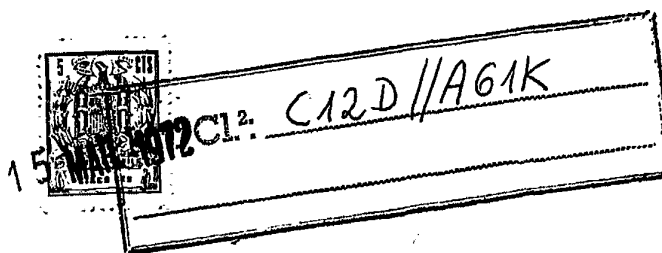


400777

400777



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

por VEINTE años

en España, a favor de la firma ZAIDAN HOJIN BISEIBUT-SU KAGAKU KENKYU KAI, entidad japonesa, establecida en No. 14-23, 3-chome, Kamiosaki, Shinagawa-ku, TOKYO (Ja pón), la cual se refiere a:

"PROCESO PARA LA PRODUCCION DE NUEVAS PEPSTATINAS"

...oOo...

MEMORIA DESCRIPTIVA

Esta invención se refiere a unos procesos para la producción de unas nuevas sustancias del grupo de la pepstatina producidas por microorganismos productores de pepstatina. Umezawa, uno de los citados inventores, y sus colaboradores descubrieron la pepstatina como agente eficaz contra la úlcera gástrica. Sus microorganismos productores han sido identificados como "Streptomyces testaceus", Hamada y Okami, y "Strepto-

5.-

10.-



- myces argenteolus var. toyonakensis" "ATCC Nº 21469 " y "ATCC Nº 21468". La pepstatina es un pentapéptido conteniendo ácido isovalérico N acilado en la N-terminal y ácido carboxílico libre en la C-terminal. (J. Antibioticos, 23, 259-262, 1970, ibid., 23. 263-265,-
- 5.- 1970). La pepstatina puede obtenerse cultivando cepa productora de pepstatina en un medio nutriente conteniendo peptona u otra fuente de nitrógeno y extrayéndola de su caldo cultivado para purificación. Puede obtenerse también la pepstatina como sus sales metálicas, amidas o ésteres, según se describe en la solicitud de "Patente española Nº 380.545", por Umezawa et al. Los inventores estudiaron los inhibidores de pepsina en el caldo cultivado de las citadas cepas productoras de pepstatina en diversas condiciones y encontraron
- 10.- más de dos sustancias similares a la pepstatina que tienen actividad anti-pepsina como la pepstatina pero se diferencian de la pepstatina en la cromatografía de capa fina en gel de sílice y en la porción de ácido graso de la pepstatina en cromatografía gaseosa de los hidrolisatos ácidos.
- 15.- 20.-
- Una de las nuevas pepstatinas llamada pepstatina B, puede cristalizarse en forma de agujas finas de sus ésteres metílicos a partir de solución con metanol. Funde a unos 254-255°C y el análisis elemental da:
- 25.- C 60.4 %, N 9.74 %; N. 938 % calculado como $C_{36}H_{67}N_5O_9$ (C 60.6 %, N 9.40 %, N 9.82 %). La rotación óptica es $(\alpha)_D^{20} = 95.5^\circ$ (C= 0.5, ácido acético). De color azul por reacción de Rydon-Smith como la pepstatina y color rojo por reacción hidroxilamina-cloruro férrico. El éster metílico de la pepstatina B es moderadamente solu-
- 30.-

400777



1972

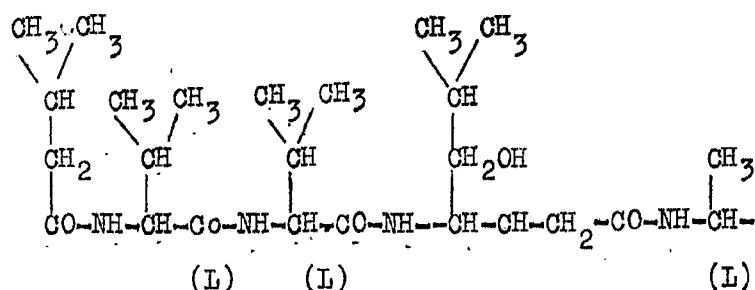
ble en dimetilformamida, dimetilsulfóxido y ácido acético, pero difícilmente soluble en agua, cloroformo, benceno, acetato de etilo y éter. Es más soluble en metanol que el éster metílico de pepstatina (5-10 mg/cc).

5.-

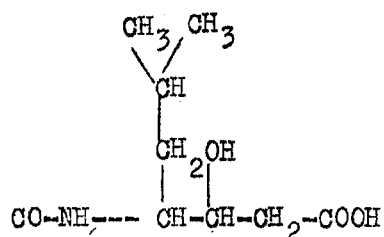
Se extrajo con éter el hidrolisato ácido del éster metílico de la pepstatina B por 20% HCl durante 16 horas a 105°C, y se aplicó a cromatografía gaseosa y a cromatografía en capa fina bidimensional. En el extracto de éter, se encontró ácido n-caproico. En la capa acuosa, se encontraron valina y alanina (2:1) además de ácido 3-hidroxi-4-amino-6-metilheptanoico. Por consiguiente, puede considerarse que la estructura de la pepstatina B es una porción de ácido graso sustituida de la pepstatina (con la siguiente estructura) por el ácido n-caproico.

10.-

15.-



20.-



25.-

En cromatografía en capa fina en gel de sílice, con el sistema de disolvente (cloroformo:metanol:ácido acético = 95:4:1), la reacción de color de Rydon-Smith del éster metílico de la pepstatina B dio un valor R_f de 0,39 y el éster metílico de la pepstatina dio 0,35. La actividad anti-pepsina del éster metílico

30.-



de la pepstatina B se demostró la misma que la del éster metílico de la pepstatina.

5.- Así como lo anterior, los inventores descubrieron que la cepa productora de pepstatina podría producir pepstatina B, cuya porción de ácido graso se sustituye por ácido caproico a partir de la molécula de pepstatina. Basándose en este descubrimiento, puede esperarse fácilmente el hallazgo de más sustancias similares a la pepstatina que se diferencian en la porción de ácido graso. Los inventores confirmaron que hay otra pepstatina llamada pepstatina C conteniendo ácido isocaproico y su éster metílico mostró el mismo valor R_f que la pepstatina B (0,39). Se ha encontrado otro grupo de pepstatinas cuyo éster metílico mostró R_f 0,42.

10.- Este principio anti-pepsina se obtuvo como cristales finos en forma de aguja y su hidrolisato ácido dio los mismos aminoácidos y 5 ácidos grasos de C_5-C_{16} en análisis por cromatografía gaseosa.

15.-

20.- Las nuevas pepstatinas mencionadas en esta invención pueden definirse como pepstatinas que contienen ácidos grasos C_5-C_{16} , tales como el ácido n-caproico y el ácido isocaproico diferente del ácido isovalérico de la pepstatina.

25.- Según esta invención, puede obtenerse las nuevas pepstatinas por los procedimientos siguientes: se inocula cepa productora de pepstatina en un medio nutritivo conteniendo caseína, leche desnatada y/o harina de soja como fuente de nitrógeno, y se incubó durante 3-10 días en condiciones aeróbicas ordinarias hasta que la actividad anti-pepsina del caldo alcanzó el máximo.

30.-

400777



-5-

ximo. El principio activo puede extraerse con n-butanol del caldo cultivado o su filtrado o con metanol de la masa micélica. El extracto así obtenido se concentra hasta jarabe o hasta precipitados amarillos. El jarabe se pone en 5-20 volúmenes de agua por goteo formando precipitado y el precipitado se filtra. Se seca el precipitado hasta el estado crudo de nuevas pepstatinas.

5.- La pepstatina cruda se disuelve en alcoholes inferiores y se esterifica calentándola o dejándola estar durante varias horas a la temperatura del ambiente o a temperaturas superiores con una pequeña cantidad de catalizadores esterificantes, tales como el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido sulfónico de paratolueno, el cloruro de tionilo, el fosforosopentacloruro, o el fosforoso-oxitricloruro, etc.. El éster metílico de las nuevas pepstatinas crudas obtenido por metilesterificación es una mezcla y la mayor parte del éster metílico de la pepstatina puede cristalizarse a partir de solución de metanol. Cuando se examinó esta fracción cristalina en cromatografía en capa fina, se encontraron el éster metílico de la pepstatina original y las nuevas pepstatinas en la proporción de 1:1. Y esta última se contenía más en el líquido madre y puede concentrarse como sigue. Los cristales se recrystalizan a partir de solución de metanol y el líquido madre se separa de los cristales. En este líquido madre, casi no existía el éster metílico de la pepstatina original y pueden recrystalizarse los ésteres metílicos purificados de las nuevas pepstatinas como agujas finas a partir de este líquido madre.

10.-

15.-

20.-

25.-

30.-

400777



-6-

- Los procedimientos de esta invención incluyen los métodos para obtener sales alcalinas de las nuevas pepstatinas por hidrólisis alcalina de los ésteres de alcohol de la nueva p-pepstatina y formas libres de las nuevas pepstatinas por neutralización de los hidrolisados alcalinos mencionados. La hidrólisis alcalina puede realizarse por el mismo procedimiento escrito en la solicitud de patente de la pepstatina original. (Solicitud de Patente Japonesa nº 46166/69). Las sales alcalinas de las nuevas pepstatinas así obtenidas, como sales sódicas de la pepstatina B son un polvo blanco amorfo con un punto de descomposición de 250-255°C y mostrando un 50 % de inhibición de la pepsina (ID_{50}) a 0,055 γ y el Id_{50} fue de 0,05 γ . Al contrario de la pepstatina, la pepstatina B (forma libre) tenía forma amorfa de polvo blanco que se obtuvo por recristalización a partir de metanol (H_2O (2:1)). Se descompuso a unos 210-220°C. La rotación específica, $(\alpha)_D^{20}$ fue -85°C (C=1.0, metanol). En la figura 2ª se muestra su espectro infrarrojo. Es fácilmente soluble en metanol (100 mg/ml), 10 veces más que la pepstatina original. Es también soluble en butanol acuoso, etanol, isopropilalcohol, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, ácido acético o piridina y ligeramente soluble en acetona acuosa, pero difícilmente soluble en acetona deshidratada, butanol deshidratado, cloroformo, benceno, éter y agua.

La presente invención se explicará con más detalle en forma de ejemplos, aunque no quede limitada a dichos ejemplos:

30.-

400777



Ejemplo 1

Se inculó una cepa de Streptomyces testaceus productora de pepstatina en un medio esterilizado, con
5.- teniendo 5,5 % de glucosa, 2,0 % de aceite de soja, -
4,5 % de leche descremada, 5,0 % de caseína de leche,
0,15 % de K_2HPO_4 , 0,35 % de NaCl, 0,15 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
(pH 6,45) de volumen 2900ℓ incubado a 23-23°C durante
112 horas con ventilación y agitación. El caldo conte
10.- nía principio anti-pepsina equivalente a 2.260γ/cc de
pepstatina. Se ajustó el pH del caldo hasta 2,5 con -
ácido sulfúrico diluido y se añadió metanol de 3.600ℓ.
A continuación se agitó este líquido durante 40 minutos
a 15-20°C, se añadió 4% de la ayuda del filtro y se fil
15.- tró y se lavó. El eluado de metanol de 6300ℓ así obte
nido se ajustó a un PH 10 por álcali y metanol avapora
do en vacío para producir residuos acuoso de 1900 ℓ . A
este residuo acuoso se añadió n-butanol de 800ℓ y se -
ajustó el pH de la mezcla hasta 7,0. Después de agita
20.- ción durante 30 minutos a 20°C, se separó el extracto
de butanol de 960ℓ . Se ajustó el pH de este extracto de
butanol hasta 3,0 y se concentró en vacío dando un ja
rabe concentrado de 55ℓ . Este jarabe se pasó gota a -
gota a agua de 800ℓ por goteo con agitación durante
60 minutos y se filtró el precipitado así formado. El
25.- precipitado se lavó con agua y se liofilizó hasta obte
ner polvo crudo de color amarillo de nuevas pepstatinas
de 7.990 g.. El principio anti-pepsina equivalente a la
pepstatina se contenía en el 64 % del polvo.

30.- Se disolvió el polvo crudo de 6080 g. así ob
tenido en metal de volumen de 33ℓ y se le añadió carbón

400777

15



-8-

- actuó de 1,25 kg. para decolorar. A esta solución de metanol decolorada de 38ℓ, se añadió ácido sulfúrico concentrado, 125 cc y se agitó durante 2,5 horas a --
- 5.- 60°C. Se neutralizó la mezcla de reacción por adición de trietilamina de 0,63ℓ y se agitó durante 120 minutos a 50-60°C, obteniéndose un polvo cristalino blanco. Este polvo se lavó y se secó en vacío hasta producir 3230 g de los nuevos ésteres metílicos de pepstatina teniendo una actividad antipepsina (LD_{50}) a --
- 10.- 0,056γ. Su punto de descomposición estaba en 250-251°C y el $(\alpha)_D^{20}$ es -90° (C=1,0, ácido acético). Este polvo contenía más de 80 % de éster metílico de pepstatina B (Rf 0,39 en cromatografía en capa fina).

Ejemplo 2

- 15.- Se disolvió el nuevo éster metílico de pepstatina de 3100 g. obtenido en el Ejemplo 1 en 130ℓ de --
- 20.- 0,2N-NaOH- al 90 % a 60°C para saponificar durante 2 horas. La mixtura de reacción se concentró en vacío -- hasta evaporar metanol y se obtuvo un concentrado fangoso. El concentrado se diluyó en 20ℓ de n-butanol saturado con agua y se añadió 15ℓ de agua ajustándose el pH hasta 3,0 por medio de ácido sulfúrico diluido. --
- 25.- Después de agitar durante 20 minutos, se pasó la capa superior de butanol de 18ℓ a agua de 270 gota a gota. El precipitado así obtenido después de agitación durante 60 minutos se filtró y se lavó con agua. El precipitado lavado se secó en vacío para dar un polvo blanco --
- 30.- de 2.500 g..Este polvo mostró un punto de descomposición a 205-210°C y $(\alpha)_D^{20} = -84°$ (C=1,0, metanol). El LD_{50} (50 % de inhibición contra la pepsina) fue de --

400777



15 -9-

0,055γ. La curva de dosificación mostró que 700 mg de la muestra consumía 9,7 cc de 0,1N NaOH.

Ejemplo 3

- 5.- Se disolvieron 100 g de los ésteres metílicos de la nueva pepstatina obtenidos en el Ejemplo 1 en 4ℓ de metanol absoluto y se decoloró con 20 g de carbón activo. La solución de metanol se mantuvo quieta durante la noche obteniéndose 24 g. de cristales blancos al principio. Se concentraron 4,2 ℓ del líquido madre metanólico hasta 1,3 ℓ ocurriendo la precipitación. Este precipitado se cristalizó después de 60 minutos con agitación de 60°C. La cristalización secundaria durante la noche dio cristales blancos de 5,5 g. como producción secundaria. Estos segundos cristales se diluyeron en 1,5 ℓ de metanol caliente y se trataron con carbón activado. La solución metanólica se dejó estar durante la noche obteniéndose 12,5 g. de cristales blancos como tercera producción.
- 10.-
- 15.-
- 20.- Las 3 sustancias cristalinas mencionadas mostraron las siguientes propiedades físico-química:

Los primeros cristales:

Punto descomposición: 250-251°C

$(\alpha)_D^{20} = -90,5^\circ$ (C=0,5, ácido acético)

$ID_{50} = 0,05\gamma$

- 25.- Rf 0,35 sustancia: Rf 0,39 sustancia = 1:1 - 1:2
(cromatografía en capa fina, cloroformo: metanol: ácido acético = 95:4:1)

Los segundos cristales:

Punto de descomposición: 253-254°C

- 30.- $(\alpha)_D^{20} = -91,5^\circ$ (C=0,5 ácido acético)

400777



-10-

$ID_{50} = 0,5$ y

Principalmente Rf 0,35 sustancia y trazas de Rf 0,42 sustancia,

(cromatografía en capa fina, cloroformo: metanol: ácido acético = 95:4:1).

5.-

Los cristales tercero:

Punto de descomposición : 254-255°C

$(\alpha)_D^{20} = -95,5^\circ$ (C=0,5 ácido acético.

$ID_{50} = 0,5$

10.-

Principalmente Rf 0,39 sustancia (pepstatina - B) y trazas de Rf 0,42 sustancia (con cromatografía en capa fina, cloroformo: metanol: ácido acético = 95:4:1)

En la figura 1^a se muestra el espectro infrarrojo.

15.-

El análisis elemental (encontrado) %

C 60,14 %, H 9,38 %, N 9,74 %

Moderadamente soluble en dimetilsulfóxido, diómetilformamida y ácido acético, difícilmente soluble en metanol (5-10 mg/cc) pero más soluble que el éster metílico de la pepstatina.

20.-

Ejemplo 4

25.-

Se inculó una cepa productora de pepstatina - en un medio esterilizado de 130ℓ conteniendo 6,0 % de glucosa, 2,0 % de glicerina, 4,0 % de leche descremada, 4,5 % de caseína de leche, 0,1 % de K_2HPO_4 , 0,3 % de NaCl, 0,1 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (ph 6,8) y se incubó durante 137 horas en las mismas condiciones del Ejemplo 1. Al caldo cultivado de 125ℓ conteniendo principio anti-pepsina equivalente a 170 g de pepstatina, se le añadió n-butanol de 60ℓ y se agitó durante 40 minutos a la --

30.-

400777



-11-

temperatura del ambiente. A continuación, se separaron por centrifugación la capa de butanol, la capa de agua y la capa sólida (masa mecánica). La capa de butanol se lavó con agua y se concentró en vacío hasta un jarabe de 1,5 l. Se ajustó el pH del jarabe hasta 3,0 y se añadió 7,5 l de n-hexano para producir un precipitado marrón amarillento con agitación. Después de agitación durante 60 minutos, se filtró el precipitado, se lavó y se secó en vacío, produciendo 164 g. de nueva pepstatina cruda, teniendo una actividad de anti-pepsina de $ID_{50} = 0,075\gamma$.

Se diluyeron 150 g. de la nueva pepstatina en 1,5 l de metanol al 90% a 40-50°C y se decoloró por 150 g. de carbón activado. A 1,6 l de la solución de metanol decolorado se le añadió 1,0 l a la temperatura del ambiente produciendo un precipitado de gel. Se filtró el precipitado, se lavó con metanol al 50 % y se liofilizó produciendo 94 g. de polvo ligeramente amarillento. Su ID_{50} contra la pepsina fue de 0,062 γ . Este polvo se diluyó el 90 % de metanol y se repitió 2 veces para tratarlo con carbón activado como se indica arriba, y se obtuvieron 45 g. de polvo blanco de la nueva pepstatina. Su ID_{50} fue de 0,055 γ . Mostró un punto de descomposición a 198-205°C y $(\alpha)_{D}^{20} = -79^{\circ}$ (C=1,0, metanol). En la cromatografía en capa fina mostró un R_f 0,35 (pepstatina), R_f 9,39 (pepstatina B y pepstatina C) y un R_f 0,42.

Ejemplo 5

Se inoculó cepa productora de pepstatina en 130 l de un medio esterilizado conteniendo 6,0 % de glucosa

30.-

400777



-12-

- sa, 2,0 % de glicerina, 1,5 % de leche descremada, 1,5% de caseina, 5,7 % de harina de soja, 0,1 % de K_2HPO_4 , 0,3% de NaCl y 0,1 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (ph 5,5) y se incubó durante 137 horas en las mismas condiciones del --
- 5.- Ejemplo 1). 110ℓ del caldo del cultivo conteniendo -- principio antipepsina equivalente a 132 g de pepstátina se filtró con adición de ayuda de filtro 7 kh y se -- ajustó a un pH de 2,0 con ácido sulfúrico diluido, y pasta miceliana separada de 33 kg (peso húmedo) y fil-
- 10.- trado de 75ℓ . Se añadió a la pasta miceliana 83ℓ - de metanol absoluto dando un fango que se agitó duran- te 40 minutos.
- Acto seguido se filtró el fango y se lavó la -
- 15.- pasta 2 veces con 40ℓ de metanol al 70 %, produciendo 140ℓ de eluato acuoso de metanol. Se añadió a 75ℓ del caldo arriba filtrado 35ℓ de n-butanol y se agitó duran- te 15 minutos, y se separaron 37ℓ de capa de butanol - de 73ℓ de dapa de agua. Se concentraron 140ℓ de elua- do de metanol acuoso arriba obtenido de la pasta micle- liana, en vacío, hasta 27 ℓ de solución acuosa, y se -
- 20.- mezcló con 37ℓ del extracto citado de butanol obtenido por el filtrado del caldo. Se centrifugó esta mixtura para eliminar la capa de agua obteniéndose 35 ℓ de ex- tracto de butanol. El extracto de butanol se ajustó -
- 25.- hasta un pH 3,0 y se concentró en vacío hasta 1,0ℓ de - jarabe. Este jarabe se echó gota agota en 15ℓ de agua y se agitó durante 60 minutos produciendo un precipita- do. Se filtró el precipitado, se lavó con agua y se se- có a 6-70°C, produciendo 158 g. de polvo amarillento de la nueva pepstatina. Su 50 % de inhibición contra la -
- 30.-

400777



-13-

5.- pepsina (ID_{50}) fue de 0,072 γ . El polvo así obtenido se esterificó en metanol como se describe en el Ejemplo 1, dando 62 g. de polvo cristalino blanco de nuevo éster metílico de pepstatina. Su $ID_{50} = 0,05\gamma$, punto de descomposición 250-252°C y $(\alpha)_D^{20} = -90,6^\circ$ (C=0,5 ácido acético).

10.- En cromatografía, en una capa fina se halló que contiene principalmente éster metílico de la nueva pepstatina (R_f 0,39) y trazas del éster metílico de la pepstatina.

15.- Se saponificaron 30 g de este nuevo éster metílico de la pepstatina así obtenido en 450 cc de solución de metanol al 90 % 0,2-NaOH durante 2 horas a 60°C. La mezcla de reacción se ajustó hasta un pH 8,5 con HCl diluido y se concentró hasta 150 cc, formando precipitado blanco. Se filtró el precipitado, se lavó con metanol y se secó en vacío produciendo polvo blanco (17,9 g.) de la nueva sal sódica de pepstatina teniendo $ID_{50} = 0,05\gamma$, punto de descomposición a 245-249°C y $(\alpha)_D^{20} = -84^\circ$ - (C=1,0 metanol). Sus 700 mg consumieron 10,1 cc de 0,1N-HCl por dosificación.

20.- Ejemplo 6

25.- Se inculó cepa productora de pepstatina en un medio esterilizado (130 λ) conteniendo 6,0, de glucosa, 20,% de glicerina, 4,2 % de caseína de leche, 1,0 % de MgSO .74 O (pH 7,0) y se incubó durante 132,5 horas en las mismas condiciones del Ejemplo 1. Se trató el caldo cultivado de 130 λ conteniendo principio anti-pepsina - equivalente a 111 g. de pepstatina de la misma forma - descrita en el ejemplo 1, produciendo 133 g. de pepsta

30.-

400777



-14-

tina nueva cruda, teniendo ID_{50} contra la pepsina = --
0,076 y .

El polvo amarillo así obtenido fue tratado en la misma forma descrita en el Ejemplo 1, produciendo -
5.- 58,5 g de nuevo éster metílico de pepstatina teniendo $ID_{50} = 0,051y$, punto de descomposición a 255-256°C y $(\alpha)_{D}^{20} = -95,5\%$ (C=0,5 ácido acético). En cromatografía en capa fina, dio un Rf de 0,35 y Rf de 0,39 --
10 - (1:1) pero el Rf 0,42 no se observó cuando el preparado de pepstatina así obtenido contenía pepstatina iguala la cantidad a la nueva pepstatina (1:1).

Ejemplo 7

La forma de ácido libre de la nueva pepstatina (4,0 g) obtenida en el ejemplo 2; se diluyó en 100 cc de metanol absoluto bajo calentamiento añadiéndose 0,2
15.- cc de H_2SO_4 concentrado. Esta mixtura se reflujo durante 6 horas en baño maría hirviendo y se concentró en vacío hasta 50 cc. El precipitado así formado se filtró, se lavó con metanol y se secó, dando 1,6 g. de polvo. El polvo se recrystalizó a partir de solución de -
20.- metanol absoluto (100 cc) y se obtuvieron 1,15 g. de polvo cristalino blanco de nuevo éster etílico de pepstatina (éster etílico de pepstatina B), teniendo $ID_{50} = 0,054y$, punto de descomposición a 250-251°C y $(\alpha)_{D}^{20} = -90\%$ (C=0,5, ácido acético).

25.-

Ejemplo 8

Se diluyeron 3,0 g. de nueva pepstatina obtenida en el Ejemplo 2 en 100 cc. de n-propilalcohol absoluto bajo calentamiento añadiéndose 0,2 cc de H_2SO_4 concentrado, esterificándose durante 6 horas a 80°C.
30.-

400777



-15-

La mixtura de reacción se concentró en vacío hasta 20,0 cc. produciendo un precipitado. Se filtró y se lavó con n-propilalcohol el precipitado, secándolo hasta dar --

5.- 900 mg de polvo blanco. Este polvo se recrystalizó a partir de 40,0 cc. de solución de propilalcohol absoluto y se obtuvieron 480,0 mg de polvo blanco (éster de pepstatina B). Mostró un $ID_{50} = 0,073y$, punto de descomposición y $218-220^{\circ}C$ y $(\alpha)_{D}^{20} = -89,5^{\circ}$ (C=0,5, ácido acético).

10.- Ejemplo 9

Se diluyeron 3,0 g. de la nueva pepstatina obtenida en el Ejemplo 2 en 100 cc de n-butanol absoluto caliente añadiéndose 0,2 cc de H_2SO_4 concentrado. Se realizó la esterificación durante 6 horas a $80^{\circ}C$ y se

15.- concentró en vacío hasta 2,0 cc conteniendo precipitados. Se filtró el precipitado, se lavó con n-butanol y se secó produciendo 800,0 mg. de polvo blanco. Este polvo se recrystalizó con 15,0 cc de solución n-butanol obteniéndose 340 mg de polvo blanco (éster n-butílico de la nueva pepstatina B) teniendo $ID_{50} = 0,084y$, punto de descomposición a $205-207^{\circ}C$ y $(\alpha)_{D}^{20} = -88^{\circ}$ (C=0,5, ácido acético).

20.-

Esta memoria se encuentra complementada mediante dos diagramas que se muestran en las hojas de dibujos anexos cuyos diagramas corresponden:

25.- Figura 1ª, éster metílico de la nueva pepstatina (KBr), número de onda CM^{-1} .

Figura 2ª, nueva pepstatina (libre) (KBr), número de onda CM^{-1} .

30.- La presente solicitud, que corresponde a la dep_



40 0777
400777

sitada en el Japón con fecha 26 de marzo de 1971, bajo el número 17292/71, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

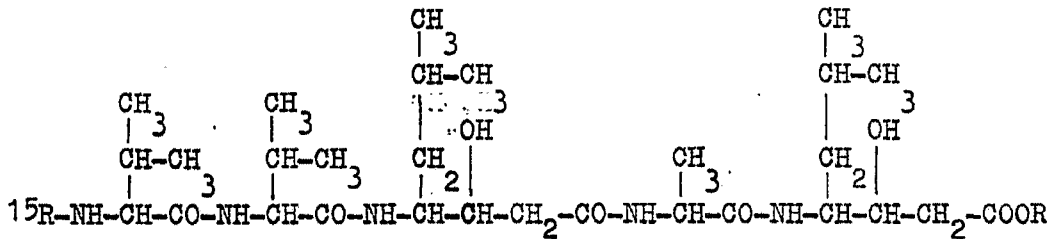
5.-

NOTA

Se declara como de propiedad y novedad para todo el territorio español, el contenido de las siguientes:

REIVINDICACIONES

10.- 1ª.- Un proceso para la producción de nuevas peptatinas, que actúen como inhibidores de las pepsinas y teniendo la fórmula:



20.- en donde R es un radical n-caproilo en el caso de "pepstatina" B, o se trata de un radical iso-caproilo en el caso de pepstatina C u un ester alquílico del mismo, con -
 25.- teniendo el grupo alkilo de 1-4 átomos de carbono, ca -
 30.- racterizado por cuanto un espécimen productor de peps -
 tatina de Streptomyces testaceus ATCC Nº 21469, o de - -
Streptomyces argenteolus var. toyonaskensis ATCC Nº - -
 21469 se cultiva en un medio nutritivo conteniendo fuen -
 tes de nitrógeno y de carbono asimilables durante 3-10
 días bajo condiciones aerobias, se extrae el medio de
 cultivo con n-butanol, se concentra el extracto a un -
 jarabe, se efectúa la precipitación añadiendo agua a -
 dicho jarabe, los derivados de la pepstatina así preci -
 pitados-se recuperan y se purifican con la ayuda de una
 metil-esterificación y más adelante, si se desea, se - -



40 0777

400777

convierten en sus respectivos esteres o sales alcali
nas.

2a.- "PROCESO PARA LA PRODUCCION DE NUEVAS PEPS
TATINAS".

5.-

Todo ello, conforme se describe y reivindica en
la presente memoria que consta de DIECISIETE hojas es
critas a máquina por una sola de sus caras y dibujos
que la ilustran.

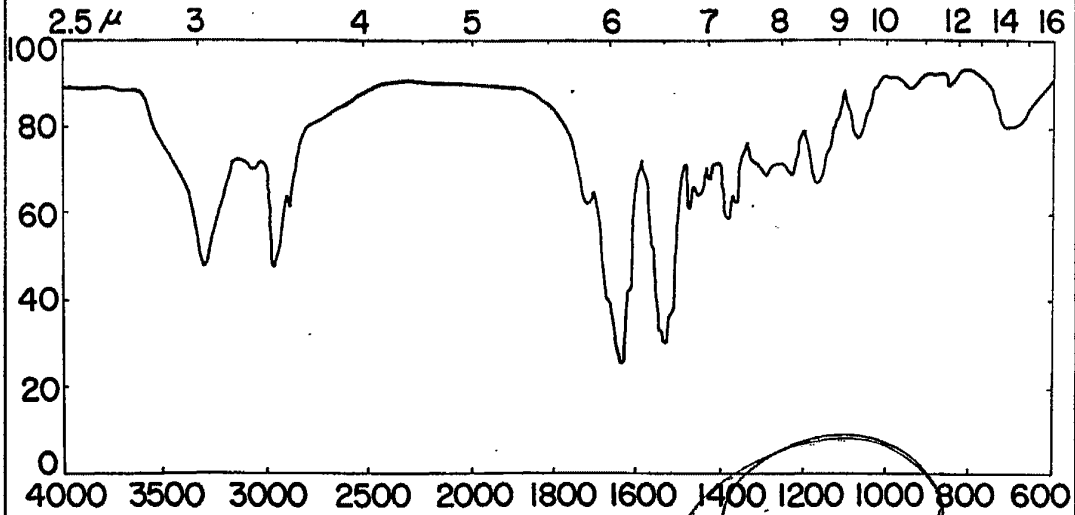
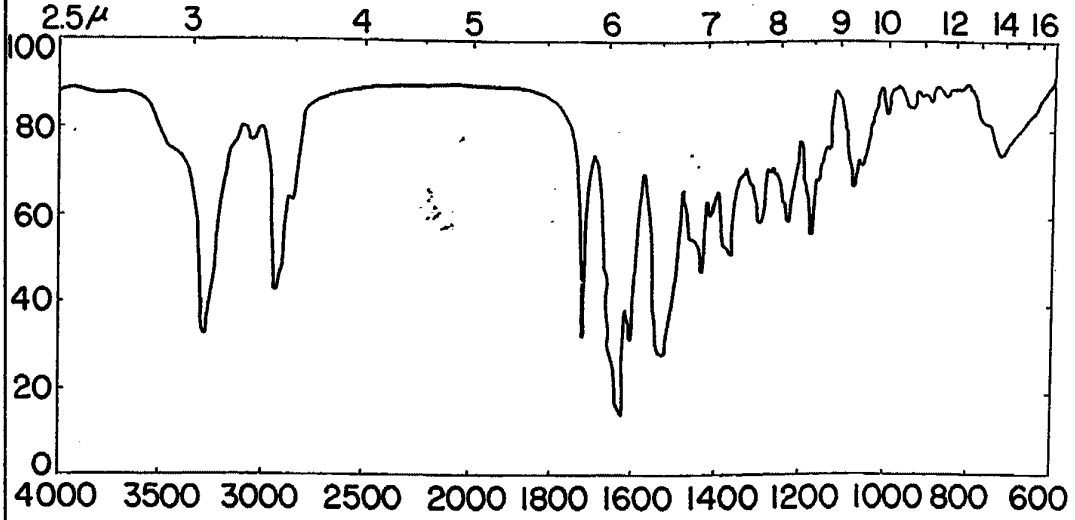
Madrid, 15 de marzo 1972

E. GONZALEZ VAGAN
P.R.

ME

400777

15 MAR 1972



Madrid, 15 de marzo de 1972

Escala Variable

~~S. GONZALEZ JACAS~~