



413425

413425

P.- 54.080

Case F-2012 B

MEMORIA DESCRIPTIVA para solicitar

F.C. 26-4-75

Int. Cl.:	C12D//A61K

PATENTE DE INVENCION en ESPAÑA

por VEINTE años

A nombre de TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

entidad japonesa

establecida en 27, Doshomachi-2-chome, Higashi-ku, Osaka, Japon.

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN INHIBIDOR DE PROTEASAS"

(Clase Internacional C12d, A61k)

413425



Esta invención se refiere a un nuevo inhibidor de proteasas y a un procedimiento para la producción del mismo.

Un estudio extenso acerca de metabolitos microbianos que los presentes inventores llevaron a cabo buscando un nuevo inhibidor de proteasas condujeron al descubrimiento de que ciertas capas del género Streptomyces son capaces de acumular una sustancia o sustancias que inhiben fuertemente la actividad de la pepsina y de otras diversas proteasas ácidas. Estudios subsiguientes de los inventores les permitieron aislar con éxito estas sustancias en forma cristalina. Tomando nota de sus propiedades, los presentes inventores designaron a dos de estos inhibidores como "pepsinoestreptina" y "pepsinoestreptina-P" y después de estudios ulteriores, completaron la presente invención.

Así pues, el objeto principal de esta invención es proporcionar pepsinoestreptina, pepsinoestreptina-P y sus ésteres metílicos, a los que se denomina aisladamente o como mezcla de más de uno, en esta Memoria Descriptiva, para simplificar, "pepsinoestreptinas", si no se especifica de otro modo.

Otro objeto de esta invención es proporcionar un procedimiento para la producción de pepsinoestreptina. Otro objeto es proporcionar una composición farmacéutica que comprende pepsinoestreptinas.

Estos objetos se realizan cultivando un microorganismo del género Streptomyces capaz de acumular pepsinoestreptinas en un medio, para hacer que el microorganismo produzca la sustancia



413425

11



ces puede seleccionarse una cepa que produzca pepsinoestreptinas entre las cepas que muestran actividades inhibitoras elevadas en el ensayo de valoración anterior.

En la presente invención se cultiva en un medio de cultivo una cepa que produce pepsinoestreptinas. El medio puede ser líquido o sólido, pero, habitualmente, son más convenientes un cultivo sometido o sacudidas o un cultivo aerobio con agitación.

La composición del medio es facultativa en tanto en cuanto la cepa empleada pueda crecer en él, acumulando dicho inhibidor de proteasas. Así pues, el medio puede contener, como fuentes de carbono, glucosa, lactosa, glicerina, almidón, sacarosa, dextrina, melazas, ácidos orgánicos, etc., y como fuentes de nitrógeno, peptona, hidrolizados de proteínas, por ejemplo, ácido casamínico (Laboratorios Difco), N-Z-Amina (Sheffield Chemical), etc., extracto de carne, extracto de levadura, torta de soja, líquido de maceración de maíz, aminoácidos, sales amónicas, nitratos y otros compuestos nitrogenados orgánicos e inorgánicos. Como sales inorgánicas pueden incorporarse al medio diversos fosfatos, sulfato de magnesio, cloruro sódico, etc. Además, para favorecer el crecimiento de los microorganismos, pueden añadirse también factores tales como vitaminas y análogos de ácidos nucleicos. Adicionalmente, los presentes inventores han descubierto que si se incorporan adicionalmente al medio de cultivo valina, N-acilvalina y/o ácido isobutírico, la acumulación de pepsinoestreptina y/o de éster metílico de pepsinoestreptina aumenta significativamente, y que cuando se añade ácido propiónico, la

413425



acumulación de pepsinoestreptina-P y/o de su éster metílico aumenta. El grupo N-acilo de dicha N-acilvalina es ilustrado mediante N-acetilo y N-benzoilo. Las cantidades recomendadas de estos aditivos son de 0,25 a 5,0% aproximadamente y, de preferencia, de 2 a 5 4% aproximadamente para la valina y la N-acilvalina; de 0,25 a 2,0% aproximadamente y, de preferencia, de 0,5 a 1,0% aproximadamente para el ácido isobutírico; y de 0,25 a 5,0% aproximadamente, de preferencia de 0,5 a 3,0% para el ácido propiónico, respectivamente.

El ácido isobutírico y el ácido propiónico pueden añadirse en forma de sal de sodio o de sal de potasio. Estos aditivos pueden añadirse al comienzo del cultivo o en diversos momentos durante el período de cultivo. Haciendo crecer los microorganismos en presencia de estos aditivos, la cantidad acumulada de las pepsinoestrep- 10 tinas buscadas puede aumentarse de 10 a 20 veces como máximo.

La incorporación en el medio de un agente antiespumante tal como aceite de silicona, un derivado de propilénglicol o aceite de soja, conduce a rendimientos mejorados de pepsinoestrep- 15 tinas.

Para cultivar el microorganismo se recomienda llevar a cabo un cultivo preliminar a pequeña escala y, después, inocu- 20 lar el medio de fermentación con el cultivo preliminar que resulta. Las condiciones de cultivo, que incluyen la temperatura y el período de incubación, el pH del medio, etc, se seleccionan y controlan de tal modo que la acumulación de las pepsinoestrep- 25 tinas pretendidas sea máxima. En muchos casos, es suficiente cultivar aerobiamen- te la cepa

413425



a unos 20° - 35°C durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 6 días, mientras el medio se mantiene en un margen de pH de 4 a 9,5 aproximadamente.

El caldo de cultivo que resulta contiene

5 pepsinoestreptinas. Cuando se emplea un medio líquido, la sustancia o sustancias buscadas se acumulan predominantemente en la fase fluida. Por consiguiente, se recomienda separar primeramente los micelios del caldo de cultivo por filtración o centrifugación y, después aislar las pepsinoestreptinas del producto filtrado o de la

10 pa sobrenadante resultantes, aun cuando el producto o productos pueden recogerse facultativamente sin separar previamente los micelios. La separación y la purificación de la sustancia o sustancias buscadas desde el caldo de cultivo pueden llevarse a cabo con facilidad utilizando diversos procedimientos en una combinación adecuada, dependiendo la elección de una combinación particular de las características

15 químicas de las pepsinoestreptinas. Así pues, pueden emplearse técnicas tales como precipitación con un agente precipitante, por ejemplo, sulfato amónico; extracción con un disolvente orgánico que no sea fácilmente miscible con agua y en el que sean solubles las

20 pepsinoestreptinas, por ejemplo, n-butanol; disolución en un disolvente muy polar tal como metanol o etanol; separación de impurezas por tratamiento, por ejemplo, con acetato de etilo o hexano; filtración a partir de gel mediante el uso de diversos glóbulos de dextrano, por ejemplo Sephadex (Pharmacia Fine Chemicals) o equivalentes;

25 cromatografía de intercambio iónico con cambiadores iónicos diver-

413425



5        sos tales como resinas de intercambio iónico, celulosa de intercambio iónico, Sephadex de intercambio iónico (Pharmacia Fine Chemicals), etc.; cromatografía de adsorción sobre adsorbentes diversos, por ejemplo carbón activo, alúmina, gel de sílice o adsorbentes macromoleculares, por ejemplo Amberlite XAD-1 y 2 (Rohm & Haas); y así sucesivamente. Como es lógico, además de estas técnicas, puede recurrirse a cualquier otro procedimiento de purificación adecuado a las propiedades de las pepsinoestrepinas. Utilizando algunos de estos procedimientos en una combinación adecuada, pueden aislarse las pepsinoestrepinas en estado cristalino desde el caldo de cultivo.

10

15        La pepsinoestrepina, la pepsinoestrepina-P y sus ésteres metílicos pueden detectarse por separado unos de otros sobre una placa de ágar con caseína-pepsina después de cromatografía en capa delgada sobre gel de sílice, utilizando sistemas disolventes adecuados como agentes de revelado. En la Tabla I que figura a continuación se indican ejemplos de tales sistemas disolventes y valores del  $R_f$  de cuatro pepsinoestrepinas con estos sistemas disolventes.

413425



Tabla 1

	Valores del Rf en	
	Disolvente A	Disolvente B
5		
Pepsinoestreptinas		
Pepsinoestreptina	0,40-0,50	0,55-0,65
Pepsinoestreptina-P	0,35-0,45	0,40-0,50
Ester metílico de pepsinoes- treptina	0,75-0,85	0,68-0,78
10		
Ester metílico de pepsinoes- treptina-P	0,73-0,83	0,56-0,66

Disolvente A : Acetato de etilo - metanol (4:1)

Disolvente B: n-Butanol - ácido acético - agua - acetato de n-  
-butilo (20:1:1:20)

15

Así pues, empleando cromatografía en capa delgada bidimensional sobre gel de sílice con los disolventes A y B como agentes de revelado, pueden detectarse por separado las pepsinoestreptinas.

20

La separación de una cualquiera de las pepsinoestreptinas desde una solución mixta de más de una de ellas, puede llevarse a cabo también aplicando los citados principios de detección. De este modo, por ejemplo, puede llevarse a cabo la separación de cada componente desde la mezcla de cuatro pepsinoestrep-

25

tinias, mediante la combinación de dos procesos sucesivos de cro-

413425



matografía en columna :

(1) En primer lugar, se separan la pepsinoestreptina y la pepsinoestreptina-P desde sus ésteres metílicos mediante cromatografía en columna de gel de sílice con acetato de etilo-metanol (5:1) como disolvente de elución, y (2) en segundo lugar, se efectúa la separación de la pepsinoestreptina desde la pepsinoestreptina-P o del éster metílico de pepsinoestreptina desde el éster metílico de pepsinoestreptina-P, mediante cromatografía en columna de gel de sílice con n-butanol-ácido acético-agua-acetato de n-butilo (30:1:1:30) como disolvente de elución.

Para la separación de la pepsinoestreptina de la pepsinoestreptina-P en la segunda etapa, puede hacerse uso de una cromatografía en columna sobre un adsorbente macromolecular tal como Amberlite XAD-2 (Rohm & Haas) con solución alcalina de metanol como disolvente de elución.

Las estructuras químicas de las pepsinoestrep-  
tinas que pueden obtenerse de este modo han sido establecidas a partir de los resultados de diversos análisis químicos y físico-químicos que serán descritos en los Ejemplos que aparecen más adelante, y son:



413425

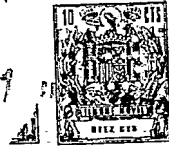


ilidad en sales metálicas tales como las sales de sodio, potasio, calcio y aluminio. Las expresiones "pepsinoestreptinas" e "inhibidor de proteasas" como se usan en esta Memoria Descriptiva y en las reivindicaciones cubren también estas sales diversas.

5 Las pepsinoestreptinas se caracterizan por su propiedad de inhibir fuertemente la actividad de la pepsina y de otras proteasas ácidas. Se empleó el procedimiento siguiente para valorar la actividad de inhibición de pepsina.

Así, 0,1 ml de una solución de pepsina cristalina (Sigma Chemical Company) con una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$ , se añadieron a 1,9 ml de un sistema de reacción que comprendía 1,0 ml de una solución al 0,6% de caseína de substrato (por ejemplo, caseína de Hammarsten, E. Merck, A.G.) en ácido láctico 0,08 M, 0,7 ml de solución tampón de HCl 0,02N-cloruro potásico 0,02 M (pH 2,0) y 0,2 ml de una solución de muestra que contenía pepsinoestreptinas. La mezcla total (2 ml) se incubó a 37°C durante 30 minutos. La reacción se terminó mediante la adición de 2,0 ml de solución de ácido perclórico 1,7 M. Después se dejó reposar la mezcla a la temperatura ambiente durante 30 minutos y, luego se filtró a través de un papel de filtro. Se midió la absorbencia (A) del filtrado a 280 m $\mu$ . Por otra parte, un sistema testigo que contenía la misma solución tampón pero estaba exento de pepsinoestreptina fué tratado y se midió su absorbencia (B) del mismo modo. que arriba se ha indicado. De una curva de calibración construida representando gráficamente absorbencias en función de concentraciones de pepsina, fueron de-

413425



terminadas las concentraciones de pepsina residual (C) y (D) de los sistemas de reacción correspondientes a (A) y (B), respectivamente, y se calculó la actividad de inhibición de proteasa de cada muestra por medio de la ecuación siguiente.

5

$$\text{Tanto por ciento (\%) de inhibición} = \frac{D - C}{D} \times 100$$

Según se valoró mediante el anterior procedimiento, la cantidad de pepsinoestreptinas requerida para inhibir el 50 por ciento de la actividad de 5 µg de pepsina cristalina (ID<sub>50</sub>) fué de 0,05 µg aproximadamente para todas las pepsinoestreptinas.

Las pepsinoestreptinas inhiben también la actividad de la proteasa ácida de Rhizopus chinensis (Seikagaku Kogyo, K.K.) y de la proteasa ácida de Trametes sanguinia (Takeda Chemical Industries. Ltd.). Según se valoró mediante un procedimiento similar al descrito anteriormente, utilizando una solución al 0,6% de caseína en ácido láctico 0,05M y una solución tampón de ácido láctico 0,05 M (pH 3,0), la cantidad necesaria para inhibir el 50% de la actividad de 10 µg de la proteasa ácida de Rhizopus chinensis fue de unos 0,05 µg y la cantidad que inhibía el 50% de la actividad de 20 µg de la proteasa ácida del Trametes sanguinia fue de unos 0,25 µg para cualquiera de las pepsinoestreptinas.

La toxicidad de las pepsinoestreptinas es sumamente baja y sus valores de DL<sub>50</sub> determinados mediante ensayos de toxicidad aguda en ratones por vía oral fueron no inferiores a 3 g/kg para

413425



la pepsinoestreptina y su éster metílico y no inferiores a 5 g/kg para la pepsinoestreptina-P y su éster metílico, y por vía intraperitoneal fueron de 0,5 g/kg para todas las pepsinoestreptinas.

5 Las pepsinoestreptinas tienen toxicidad baja, son estables a lo largo de un amplio margen de pH, hidrófilas, y fácilmente cristalizables, son retenidas largo tiempo en el estómago y tienen una predisposición específica para inhibir la actividad de la pepsina evitando la liberación de ácido siálico desde las mucosas gástricas, evitando o curando la úlcera en ratas Shay (úlceras provocadas artificialmente).

10

Por lo tanto, las pepsinoestreptinas pueden usarse como medicamentos para la prevención y la cura de hiperpepsias, hiperpepsinias, úlceras gástricas y duodenales, de las que se dice que la pepsina es un factor causante, y para la normalización de la acidez gástrica.

15

A título de ilustración, en la Tabla 2 se indica el efecto de las pepsinoestreptinas sobre las úlceras gástricas en ratas que han sido inducidas mediante ligadura del piloro (véase Gastroenterology 5, 43 (1945)). Los resultados confirman la eficacia de las pepsinoestreptinas.

20

413425

Tabla 2 La actividad anti-ulceración de las pepsinoestrepinas.

Dosis (mg/animal)	Jugos gástricos			Indice de úlceras	
	Volumen total (ml)	Acidez total (peq/ml)	Actividad de pepsina (µg/ml)		
5	Sin adición	18,8	105,0	1520	4,6± 0,4
10	Pepsinoestrepina				
I	0,2	16,7±0,7	122,6±1,9	106 ± 54	1,2± 0,2
	2,0	20 ± 0,9	124,0±6,1	0 ± 0	1,0± 0
	Ester metílico de pepsinoestrepina				
15	0,2	17,4±1,1	106,6±15,8	136±89	1,4± 0,4
	2,0	18,8±0,5	122,0± 2,5	0 ± 0	0,8± 0,2
	Sin adición	14,5± 1,5	112,5 ± 1,5	1253± 58	4,0 ± 0,6
20	Pepsinoestrepina-				
	-P				
II	0,5	17,8± 1,0	95,6± 4,0	123± 35	1,3± 0,2
	1,0	16,5± 0,8	85,2± 5,4	37± 64	0,9± 0,2
	Ester metílico de pepsinoestrepina-P				
25	1,0	16,0± 1,1	80,5± 8,5	23±16	1,0±0,2

413425



(Nota a la Tabla 2)

Ratas macho, SD, de 7 semanas de edad, estando compuesto cada grupo por 5 animales. Inmediatamente después de ligar el píloro, se administraron por vía oral a los animales las pepsinoestrep-  
5 treptinas respectivas. Luego, después de 16- 17 horas, se examinó el estómago de cada animal y se clasificaron los índices de úlceras mediante el esquema siguiente:

- 0 : Normal, sin úlceras.
- 1 : No hay úlceras, pero se observan manchas hemorrágicas o erosiones.
- 10 2 a 4 : Intermedio entre 1 y 5; con úlceras pero sin perforaciones.
- 5 : Perforaciones. La mayor parte de las ratas habían muerto.

De 18 pacientes con úlcera péptica (13 úlceras gástricas, 4 úlceras duodenales y 1 úlcera gastroduodenal; 14 pacien-  
15 tes del sexo masculino y 4 pacientes del sexo femenino, de edades comprendidas entre 19 y 64 años) 12 recibieron pepsinoestrep-  
tina y 6 recibieron éster metílico de pepsinoestrep-  
tina, todos ellos en una dosis diaria de 200 mg en 4 tomas a 2-3 horas después de cada comida y antes de acostarse por la noche, y los pacientes fueron examinados después de 4 semanas.

- 20 1. Tendencias evidentes a la curación observadas por rayos X y exámenes gastroscópicos: 13 casos (desaparición de úlceras:10; alivio de las úlceras:3).
- 2. Desaparición de síntomas subjetivos: 14 casos.
- 3. Disminución de la acidez gástrica (desde hiperacidez a normal):  
25 4 de 7.

413425



4: Ensayos para determinar sangre oculta en las heces: negativos en 13 casos.

Del mismo modo, se administró pepsinoestrepina-P a 6 pacientes con úlceras pépticas (3 úlceras gástricas, 2 úlceras duodenales y 1 úlcera gastroduodenal; 5 hombres y 1 mujer, edades comprendidas entre 23 y 64) en una dosis diaria de 200 mg en 4 tomas a 2-3 horas después de cada comida, y antes de acostarse por la noche, y después de 4 semanas los pacientes fueron examinados.

1. Tendencias evidentes a la curación observadas por rayos X y exámenes gastroscópicos: 5 (desaparición de úlceras:4; alivio de úlceras: 1).
2. Desaparición de síntomas subjetivos: 5.
3. Disminución de la acidez gástrica (desde hiperacidez a normal): 1 de 3.
4. Ensayos para determinar sangre oculta en las heces; negativo en 5 casos.

En ninguno de los casos se detectó efecto secundario alguno.

En otro experimento, las actividades de pepsina de muestras de jugo gástrico procedentes de un caso de úlcera gástrica (hombre, 23 años de edad) fueron de 0,40 mg/ml para jugo gástrico basal después de estar en ayunas y de 0,67 mg/ml para una muestra de jugo gástrico tomada 45 minutos después de estimular con tetragastrina, y 50% de la actividad proteolítica correspondiente a 2 µg de pepsina en estos jugos gástricos fue inhibida por 0,061 µg y 0,051 µg, respectivamente,

413425

11



de pepsinoestreptina e inhibida por 0,058  $\mu$ g y 0,050  $\mu$ g, respectivamente, de pepsinoestreptina-P.

En la administración anterior, las dosis diarias recomendadas de pepsinoestreptina y de pepsinoestreptina-P para adultos son, aproximadamente, de 1 mg a 10 g y, de preferencia, de 5 mg a 5g en administración oral.

Las pepsinoestreptinas pueden ser administradas solas o combinadas con un excipiente o excipientes farmacéuticamente aceptables. Son administrables en forma de polvos, tabletas, soluciones o emulsiones para administración oral.

Pueden prepararse composiciones farmacéuticas que contienen una o más de las pepsinoestreptinas mediante métodos convencionales per se para la preparación de polvos, cápsulas, tabletas, píldoras y semejantes. La elección de excipientes puede determinarse según la vía de administración, la solubilidad de las pepsinoestreptinas y factores semejantes.

Esta invención será ilustrada adicionalmente mediante los ejemplos que figuran a continuación. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos se proporcionan solamente con propósitos ilustrativos y en modo alguno son limitativos de esta invención. En los ejemplos, la relación entre parte(s) en volumen y parte(s) en peso corresponde a la existencia entre mililitro(s) y gramo(s).

Ejemplo 1

(1) Producción de pepsinoestreptinas

Se utilizó Streptomyces ramulosus IFO 12812 para

413425

11 JU



inocular 30 partes en volumen de un medio líquido (pH 7,0) en un  
matraz con una capacidad de 200 partes en volumen que comprende 3%  
de glucosa, 2% de líquido de maceración de maíz, 0,05% de hidrógeno-  
fosfato dipotásico, 0,02% de sulfato amónico, 0,05% de sulfato de mag-  
5 nesio y 0,5% de carbonato cálcico, y el medio se incubó en un agita-  
dor giratorio a 28°C durante 2 días. Se utilizaron en cada caso quin-  
ce partes en volumen del líquido de cultivo resultante para inocular  
cada vez 500 partes en volumen de los dos medios líquidos de la mis-  
ma composición anterior y se cultivaron en un agitador giratorio a 28°C  
10 durante 2 días. El cultivo así obtenido (1000 partes en volumen en to-  
tal) se usó para inocular 30.000 partes en volumen de un medio líqui-  
do (pH 7,0) contenido en un fermentador con una capacidad de 50.000  
partes en volumen, compuesto por 1% de glucosa, 0,7% de peptona, 0,3%  
de extracto de carne, 0,3% de cloruro sódico y 0,2% de hidrógeno fos-  
15 fato dipotásico, y con la adición de 30 partes en peso de un agente  
antiespumante el fermentador se incubó a 28°C bajo aireación y con  
agitación durante 5 días.

El caldo de cultivo resultante se filtró con  
un filtro prensa utilizando tierra de diatomeas como auxiliar de fil-  
20 tración, y el producto filtrado resultante se trató con unas 15.000  
partes en volumen de acetato de etilo. La capa en acetato de etilo se  
desechó y la capa acuosa se trató dos veces cada vez con 30.000 par-  
tes en volumen de n-butanol para extraer la fracción activa. El ex-  
tracto en n-butanol se concentró y el concentrado se disolvió en  
25 3.000 partes en volumen de metanol.

413425



La solución se hizo pasar a través de una columna de 500 partes en volumen de carbón activo y se recogieron y concentraron 7.500 partes en volumen del eluato, con lo que se obtuvieron 13 partes en peso de un polvo.

5 Este polvo se lavó a fondo con acetato de etilo, desechándose los líquidos de lavado, y el residuo se disolvió en metanol al 50%.

La solución metanólica se aplicó sobre una columna de carbón activo (500 partes en volumen) y, después de lavar la columna con 1.500 partes en volumen de metanol al 50%, se eluyó la fracción activa con 2.000 partes en volumen de metanol, y se concentró el eluato, con lo que se obtuvieron 11 partes en volumen de polvo blanco. Puede llevarse a cabo una purificación adicional de la manera siguiente. Una porción de 0,15 partes en peso de este polvo se disolvió en una pequeña cantidad de una mezcla disolvente de n-butanol-ácido acético-agua-acetato de butilo (30:1:1:30) y la solución se vertió sobre una columna de gel de sílice (967 partes en volumen, la relación de diámetro interior a altura es de 4 a 77) y las fracciones activas fueron eluidas con el mismo disolvente. La primera fracción (1.000 partes en volumen) se desechó y la fracción siguiente de 300 partes en volumen (ésta corresponde a la fracción activa de pepsinoestreptina) y la fracción de 150 partes en volumen, después de la elución de 1.600 partes en volumen (ésta corresponde a la fracción activa de pepsinoestreptina-P) fueron recogidas, respectivamente, y se concentraron a sequedad. Después, los respectivos concentrados se disolvieron en metanol y se dejaron

413425



reposar a temperatura ambiente, con lo que se separaron agujas blancas de pepsinoestreptina y pepsinoestreptina-P. Los respectivos cristales se recrystalizaron repetidamente en metanol, pesando los cristales finales 0,025 y 0,01 partes en peso, respectivamente.

(2) Análisis de los cristales obtenidos

Se llevaron a cabo con los cristales diversos análisis fisicoquímicos.

413425



Tabla 3 Propiedades fisicoquímicas de la pepsinoestreptina y de la pepsinoestreptina-P

	Pepsinoestreptina	Pepsinoestreptina-P
5		
1. P. de F.	236° - 238°C	210° - 212°C
2. $[\alpha]_D^{25}$	-91,5° (0,53%, me tanol)	-92,9° (0,49%, metanol)
3. análisis elemental	C, 59,12; H, 9,34; N, 10,59	C, 57,53; H, 9,05; N, 10,52
10 4. Espectro de absor- ción ultravioleta	No hay máximos de absorción a 210- 400 m $\mu$	No hay máximos de ab- sorción a 210-450 m $\mu$ .
5. Espectro de absor- ción infrarrojo	Véase Fig. 1	Véase Fig. 2
15 6. Espectro de reso- nancia magnética nuclear	Véase Fig. 3	Véase Fig. 4
20 7. Espectro de masas del éster metílico	Véase Fig. 5, máximo de ión molecular: 685 m/e	Véase Fig. 6, máximo de ión/molecular: 671 m/e
8. ID <sub>50</sub> frente a pep- sina (5 $\mu$ g)	0,048 $\mu$ g	0,05 $\mu$ g



413425

Tabla 3 (continuación) Propiedades fisicoquímicas de la pepsinoestrepina y de la pepsinoestrepina-P

	Pepsinoestrepina	Pepsinoestrepina-P
5		
9. Componentes	alanina:valina:ácido 4-amino-3-oxi-6-metil-heptanóico = 1:2:2 aproximadamente	alanina:valina:ácido 4-amino-3-oxi-6-metil-heptanóico = 1:2:2
10	1,1 mg de ácido isobutírico de 10 mg de cristales	aproximadamente 1,0 mg de ácido propiónico de 10 mg de cristales.

15

Ejemplo 2

(1) Producción

Se usó Streptomyces citricolor Ferm-P-Nº 393(ATCC ) para inocular 30 partes en volumen de un medio líquido (pH 7,0) en un matraz con una capacidad de 200 partes en volumen, estando el medio líquido compuesto por 3% de glucosa, 2% de líquido de maceración de maíz, 0,05% de hidrogenofosfato dipotásico, 0,02% de sulfato amónico, 0,05% de sulfato de magnesio, 0,5% de carbonato cálcico y el medio inoculado se incubó en un agitador giratorio a 28°C durante 2 días. El cultivo resultante se transfirió a un matraz con una capacidad de 2.000 partes en volu-

413425



men que contenía 500 partes en volumen del mismo medio anterior y el matraz se incubó en un agitador de vaivén a 28°C durante 2 días. El cultivo resultante se transfirió a un fermentador de 50.000 partes en volumen de capacidad, que contenía 30.000 partes en volumen del mismo medio líquido anterior y, con la adición de un agente antiespumante, el medio inoculado se incubó a 28°C durante 2 días con agitación y aireación.

El cultivo resultante se usó para inocular 1.000.000 partes en volumen de un medio líquido (pH 7,0) contenido en un fermentador con una capacidad de 2.000.000 partes en volumen, el cual medio líquido comprendía 1% de glucosa, 3% de peptona, 0,7% de extracto de carne, 0,3% de cloruro sódico y 0,2% de hidrógenofosfato dipotásico, con la adición de unas 500 partes en peso de un agente antiespumante, el medio inoculado se incubó a 28°C con aireación y agitación durante 3 días, obteniendo aproximadamente 1.000.000 partes en volumen de un caldo de cultivo.

Este caldo de cultivo contenía una actividad inhibidora de pepsina de 10,5 µg/ml en términos de pepsinoestrepina, pero mediante el uso combinado de cromatografía en capa delgada y el método de valorar inhibidores de pepsina utilizando una placa de agar con caseína-pepsina que se ha descrito anteriormente, se encontró que este caldo de cultivo contenía por lo menos dos inhibidores de pepsina diferentes.

## (2) Análisis

Se efectuó cromatografía en capa delgada sobre



413425

muestras del caldo utilizando un sistema disolvente de acetato de etilo-metanol (4:1) y después el disolvente adherido a la capa se separó por evaporación para obtener una capa seca. Entretanto se preparó una solución acuosa de agar al 3% y se mezcló con una solución de caseína al 0,4% (pH 2,0) en la proporción de 1:1 (v/v). Después de enfriar la mezcla a 50°C, se añadió rápidamente una solución de pepsina cristalina para dar una concentración de 2 mg por 100 ml de la mezcla, seguido inmediatamente de agitación.

La mezcla se vertió en una placa de Petri y se dejó reposar un poco tiempo para preparar una placa de agar con caseína-pepsina de 2 a 3 mm de espesor. La capa delgada seca anteriormente preparada se superpuso sobre esta placa de agar y el conjunto se mantuvo en frío durante unos 10 minutos para permitir que los factores activos desarrollados sobre la capa delgada se difundieran dentro del agar. Entonces, se separó la capa delgada y se dejó en reposo la placa de agar a 37°C durante la noche. La placa de agar se vuelve transparente debido a la acción proteolítica de la pepsina, pero si se encuentra presente una sustancia inhibidora de la pepsina, el agar permanece opaco y turbio. Por consiguiente, este método proporciona un ensayo conveniente para inhibidores de pepsina. Mediante este método se detectaron dos inhibidores que dieron manchas distinguibles a Rf 0,75-0,85 y Rf 0,4-0,5, respectivamente, en una cromatografía en capa delgada con el sistema disolvente antes mencionado.

413425

11



Por lo tanto, estas dos sustancias fueron separadas y purificadas independientemente. En primer lugar, el caldo de cultivo anterior se ajustó a pH 4 con ácido clorhídrico y, después, se filtró por medio de un filtro prensa. El filtrado se ajustó a pH 8  
5 con una solución de hidróxido sódico y, luego, se extrajo con 300.000 partes en volumen de n-butanol. La capa en n-butanol se concentró y se trató con carbón activo una décima parte en peso del concentrado.

Se separó por filtración el carbón. El filtrado se  
10 vertió sobre una columna de gel de sílice y la fracción activa se desorbió con una mezcla de disolvente de acetato de etilo-metanol (4:1). Todas las fracciones activas se reunieron, se concentraron y se cromatografiaron sobre una columna de gel de sílice en las mismas condiciones anteriores, obteniendo por separado las fracciones ac-  
15 tivas I y II. La fracción I se concentró y el concentrado se cromatografió utilizando una columna de gel de sílice y una mezcla disolvente de benceno-metanol-ácido acético (90:10:1). La fracción activa obtenida de este modo se concentró y vertió sobre una columna de carbón activo. Después de lavar con una solución acuosa de metanol  
20 al 60%, la fracción activa se eluyó con metanol y el eluato se concentró. Este concentrado se vertió de nuevo sobre una columna de Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals) y la fracción activa se eluyó con metanol. El eluato se concentró y se dejó en reposo, con lo cual se obtuvieron 0,10 partes en peso de agujas blancas (I).

25

Entretanto, en las mismas condiciones empleadas pa-

413425

11



ra la fracción activa I, se purificó la fracción II mediante cromatografía en columna sobre columnas de gel de sílice y de carbón activo, obteniendo 0,41 partes de agujas blancas (II) partiendo de una solución en metanol. Los valores Rf de estos productos en el cromatograma en capa delgada antes mencionado fueron de 0,75 a 0,85 para I y de 0,4 a 0,5 para II.

La Tabla 4 muestra los diversos datos fisicoquímicos de I, II y del éster metílico de II, preparándose este último por tratamiento de II con diazometano. Los espectros de absorción infrarrojos de estos compuestos se muestran en la Fig. 7.

Tabla 4.- Propiedades fisicoquímicas de I, II y del éster metílico de II

	I	II	Ester metílico de II
P. de F.	270-272°C	237-239°C	271-273°C
$[\alpha]_D^{25}$	-91° (0,25%, metanol)	-95° (0,5%, metanol)	-85° (0,5%, metanol)
Análisis elemental	(C <sub>34</sub> H <sub>63</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub> )	(C <sub>33</sub> H <sub>61</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub> )	(C <sub>34</sub> H <sub>63</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub> )
Calculado	C, 59,56; H, 9,20; N, 10,22	C, 59,02; H, 9,09; N, 10,43	C, 59,56; H, 9,20; N, 10,22

413425



Tabla 4 (continuación).-- Propiedades fisicoquímicas de I, II y del éster metílico de II

	I	II	Ester metílico de II
5			
	C, 59,50;	C, 58,50;	C, 59,21;
Encontrado	H, 9,16;	H, 9,14;	H, 9,35;
	N, 10,03	N, 10,51	N, 9,71
10			

De estos datos y de los resultados de experimentos efectuados mediante los diversos procedimientos analíticos descritos en el Ejemplo 1, se identificó que II era pepsinoestrepina igual a la obtenida en el Ejemplo 1.

15 Por otra parte, I estaba en concordancia total con II en sus aminoácidos y ácidos grasos constituyentes. La fórmula molecular asignada a I partiendo de su análisis elemental (Tabla 4) fue  $C_{34}H_{63}N_5O_9$  y ésta excedía a la fórmula molecular de II, calculada de modo semejante,  $C_{33}H_{61}N_5O_9$ , en un átomo de carbono y dos átomos de hidrógeno. De estos datos experimentales se determinó finalmente que I era el éster metílico de II.

20

Las actividades inhibitoras de la pepsina,  $DI_{50}$ , eran de 0,054  $\mu g$  para los cristales I y de 0,045  $\mu g$  para los cristales II.

413425

11 1112



Ejemplo 3

Se usó Streptomyces ramulosus IFO 12812

(ISP 5100) para inocular 30 partes en volumen de un medio líquido (pH 7,0), en un matraz con una capacidad de 200 partes en volumen, el medio líquido estaba compuesto por 5% de dextrina, 3% de harina de soja, 0,7% de peptona, 0,5% de carbonato cálcico, 0,05% de sulfato ferroso, 0,05% de sulfato manganoso, 0,05% de sulfato de magnesio, 0,05% de hidrogenofosfato dipotásico y concentraciones variables de un miembro seleccionado entre el grupo de DL-valina, L-valina, D-valina, N-acetil-DL-valina y N-benzoil-DL-valina. El medio inoculado se incubó en un agitador giratorio a 28°C durante 4 días y se midió la producción de pepsinoestreptina en el caldo de cultivo resultante.

Los resultados se indican en la Tabla 5

Tabla 5 Efecto de la adición de valina y N-acilvalina sobre la acumulación de pepsinoestreptina

Aditivo, %	Pepsinoestreptina acumulada (mg/ml)
-----	0,13
DL-valina 0,25	0,28
25 0,5	0,42

413425

17 JUN.



Tabla 5 (continuación) Efecto de la adición de valina y N-  
-acilvalina sobre la acumulación de  
pepsinoestreptina

5	Aditivo, %	Pepsinoestreptina acumu- lada mg/ml)
	1,0	0,67
10	2,0	0,99
	4,0	0,84
	L-valina 2,0	1,03
15	D-valina 2,0	0,98
	N-acetil-DL- -valina 2,0	0,95
20	N-benzoil-DL- -valina 2,0	0,80

3.6.73  
FC

413425



Ejemplo 4

Se cultivó Streptomyces citricolor Ferm-P-  
-No.393 (ATCC ) a 28°C durante 4 días por un procedimien-  
to similar al descrito en el Ejemplo 3 y se valoraron indepen-  
5 dientemente las cantidades acumuladas de pepsinoestreptina y de  
éster metílico de pepsinoestreptina mediante el método de la pla-  
ca de agar con caseína-pepsina descrito en el Ejemplo 2.

Los resultados se indican en la Tabla 6.

10 Tabla 6 Efecto de la adición de valina y N-acilvalina so-  
bre la acumulación de pepsinoestreptina y éster me-  
tílico de pepsinoestreptina

Aditivo		Pepsinoestreptina acumulada (µg/ml)	Ester metílico de pepsinoes- treptina acumu- lado (µg/ml)
	-----	8,0	2,1
20	DL-valina 2%	60	15
	L-valina 2%	63	15
	D-valina 2%	59	14
	N-acetil-DL- valina, 2%	41	12
25	N-benzoil-DL- valina, 2%	39	10

413425



Ejemplo 5

Se utilizó Streptomyces ramulosus IFO 12812 o Streptomyces catenulae IFO 12848 (ATCC 12476), para inocular 50 partes en volumen de un medio líquido (pH 7,0) en un fermentador con 200 partes en volumen de capacidad, que comprendía 5% de dextrina, 3% de harina de soja, 0,7% de peptona, 0,5% de carbonato cálcico, 0,05% de sulfato ferroso, 0,05% de sulfato manganoso, 0,05% de sulfato de magnesio, 0,05% de hidrógenofosfato dipotásico y concentraciones variables de ácido propiónico, seguido de incubación a 28°C durante 4 días. Se midió la cantidad de pepsinoestrep-  
tina-P acumulada en cada uno de los caldos de cultivo resultantes. Los resultados se indican en la Tabla 7.

Tabla 7 Efecto de la adición de ácido propiónico sobre la acumulación de pepsinoestrep-tina-P

Concentración de ácido propiónico %	Pepsinoestrep-tina-P acumulada (mg/ml)	
	IFO 12812	IFO 12848
0	0,05	0,02
0,5	0,31	0,10
1,0	0,56	0,19
2,0	0,80	0,28
3,0	0,68	0,23

413425



Ejemplo 6

Se usó Streptomyces ramulosus IFO 12812 para  
inocular cada vez 500 partes en volumen de un medio líquido (pH  
7,0) en dos matraces con una capacidad de 2.000 partes en volumen  
5 cada uno, el cual medio líquido comprendía 3% de glucosa, 2% de lí-  
quido de maceración de maíz, 0,05% de hidrógenofosfato dipotásico,  
0,02% de sulfato amónico, 0,05% de sulfato de magnesio y 0,5% de  
carbonato cálcico. Cada uno de los matraces se incubó en un agita-  
dor en vaivén a 28°C durante 2 días para obtener 1000 partes en vo-  
lumen de un cultivo.

Este cultivo de siembra se transfirió a un  
fermentador con una capacidad de 50.000 partes en volumen que con-  
tenía 30.000 partes en volumen del mismo medio anterior, y el con-  
junto se incubó bajo aireación y agitación a 28°C durante 2 días.

15 El cultivo resultante se transfirió de nuevo  
a un fermentador con una capacidad de 2.000.000 partes en volumen  
que contenía 1.000.000 partes en volumen de un medio líquido (pH  
7,0) que comprendía 5% de dextrina, 3% de harina de soja, 0,7% de  
peptona, 0,5% de carbonato cálcico, 0,05% de sulfato ferroso, 0,05%  
20 de sulfato manganeso, 0,05% de sulfato magnésico, 0,05% de hidrógeno-  
fosfato dipotásico y 0,5% de propionato sódico (0,39% como ácido  
propiónico). Con la adición de unas 500 partes en peso de un agente  
antiespumante, el medio inoculado se incubó con aireación y agita-  
ción, a 28°C. Después de 16 horas, se añadieron 100.000 partes en  
25 volumen de una solución acuosa al 15% de propionato sódico que había

413425



sido ajustada previamente a un pH alrededor de 7,0 y esterilizada, y el medio se incubó posteriormente bajo aireación y agitación durante 74 horas. El caldo de cultivo resultante, aproximadamente 1.100.000 partes en volumen, se trató mediante el procedimiento que se describe más abajo para cristalizar la pepsinoestreptina-P. Así, el caldo de cultivo se filtró en primer lugar por medio de un filtro prensa con ayuda de tierra de diatomeas y el filtrado resultante se trató con 300.000 partes en volumen de acetato de etilo. La capa en acetato de etilo se desechó y la capa en agua se concentró hasta unas 850.000 partes en volumen, se ajustó a pH 4,0 con ácido clorhídrico y se aplicó sobre una columna de 100.000 partes en volumen de carbón activo (calidad Shirasagi, Takeda Chemical Industries), con lo que se adsorbió la fracción activa.

La columna se lavó en primer lugar con 200.000 partes en volumen de agua y después con 300.000 partes en volumen de metanol al 40% en agua, y la fracción activa se desorbió con 500.000 partes en volumen de metanol.

Se concentró el eluato obteniéndose 600 partes en peso de un polvo que contenía pepsinoestreptina-P.

Una porción de 50 partes en peso de este polvo se disolvió en 3.000 partes en volumen de hidróxido sódico 0,05 N-metanol (55:45) y, después de ajustarse a pH 10, se vertió la solución sobre una columna de 44.000 partes en volumen (la relación del diámetro interior respecto de la altura es de 1 a 7), de un adsorbente molecular, por ejemplo, Amberlite XAD-2 (Rohm & Haas) de

3.6.73  
FC

413425



0,149 mm a 0,074 mm de tamaño de partículas.

La fracción activa se eluyó en un sistema de gradiente lineal desde hidróxido sódico 0,05N-metanol (55:45) hasta hidróxido sódico 0,05N-metanol (35:65), 200.000 partes en volumen en total.

La primera fracción, que ascendía a 80.000 partes en volumen, se desechó y la fracción subsiguiente, que ascendía a 40.000 partes en volumen y que contenía pepsinoestreptina-P, se recogió y se ajustó a pH 3 con ácido clorhídrico, aplicándose después sobre una columna rellena con 2.000 partes en volumen de carbón activo.

La columna se lavó con agua y metanol al 40% en agua, seguido de elución de la pepsinoestreptina-P con metanol. El eluato se concentró a sequedad, recogándose 28 partes en peso de un polvo blanco. Este polvo se disolvió en metanol caliente y se dejó en reposo la solución, con lo que se obtuvieron 25 partes en peso de pepsinoestreptina-P en forma de agujas blancas (P. de F. 210°-211°C; análisis elemental C, 57,58; H, 9,06; N, 10,51).

Ejemplo 7

Streptomyces ramulosus IFO 12812 y Streptomyces citricolor Ferm-P-N°393(ATCC ) se utilizaron respectivamente para inocular 30 partes en volumen de un medio líquido (pH 7,0) contenido en un matraz con una capacidad de 200 partes en volumen, que comprendía 5% de dextrina, 3% de harina de soja, 0,7% de peptonas, 0,5% de carbonato cálcico, 0,05% de sulfato ferroso, 0,05%

413425



de sulfato manganoso, 0,05% de sulfato de magnesio y 0,05% de hidrógenofosfato dipotásico. Con la adición de una solución al 25% de isobutirato sódico (ajustada a pH 7,0) o bien inmediatamente después de la inoculación o bien en el transcurso del cultivo, el medio inoculado se incubó en un agitador giratorio a 28°C durante 4 días. Las producciones de pepsinoestreptina y de éster metílico de pepsinoestreptina en el caldo de cultivo resultante, se valoraron independientemente mediante el método descrito en el Ejemplo 2. Los resultados se indican en la Tabla 8.

10      Tabla 8      Efecto de la adición de isobutirato sódico sobre la acumulación de pepsinoestreptina y éster metílico de pepsinoestreptina

15	Microorganismo	Modo de adición del isobutirato de sodio	Pepsinoestrep tina acumulada (mg/ml)	Ester metílico de pepsinoestreptina (mg/ml)
		No hay adición	0,11	
20	<u>Streptomyces ramulosus</u>	0,5% a 0 horas	0,43	
		0,5% a 18 horas	0,48	
	IFO 12812 (ISP-5100)	0,5% a 0 horas y 1,0% a 18 (horas 1,5% en total)	0,59	
25				

413425



Tabla 8 (continuación) Efecto de la adición de isobutirato sódico sobre la acumulación de pepsinoestreptina y éster metílico de pepsinoestreptina

5	Microorganismo	Modo de adición del isobutirato de sodio	Pepsinoestrep- tina acumula- da (mg/ml)	Ester metíli- co de pepsi- noestreptina (mg/ml)
10	<u>Streptomyces</u>			
	<u>citricolor</u>	No hay adición	0,0072	0,0019
	Ferm-P-No.393	0,5% a 0 horas	0,036	0,0074
	(ATCC )	0,5% a 18 horas	0,031	0,0087
		0,5% a 0 horas	0,042	0,0093
15		y 1,0% a 18 horas		

Ejemplo 8

Se usó Streptomyces citricolor Ferm-P-No.393 (ATCC ) para inocular 30 partes en volumen de un medio líquido (pH 7,0) contenido en un matraz con una capacidad de 200 partes en volumen, el cual medio líquido comprendía 3% de glucosa, 2% de líquido de maceración de maíz, 0,05% de hidrogenofosfato dipotásico, 0,02 de sulfato amónico, 0,05% de sulfato de magnesio y 0,5% de carbonato cálcico.

El medio inoculado se incubó a 28°C durante 2 días



413425

y se transfirió a un matraz con una capacidad de 2.000 partes en volumen que contenía 500 partes en volumen del mismo medio anterior, durante otros 2 días más de incubación a 28°C. El caldo resultante se transfirió a un fermentador con una capacidad de

5 50.000 partes en volumen que contenía un medio líquido (pH 7,0) compuesto de 1% de glucosa, 3% de peptona, 0,7% de extracto de carne, 0,3% de cloruro sódico, 0,2% de hidrógeno dipotásico, 0,5% de propionato sódico (0,39% como ácido propiónico).

Con adición de unas 20 partes en peso de un

10 agente antiespumante, el medio inoculado se cultivó a 28°C con aireación y agitación. A las 16 horas después del comienzo se añadieron 3.000 partes en volumen de una solución acuosa de ácido propiónico (15%) y se llevó a cabo la incubación durante 50 horas más obteniéndose 33.000 partes en volumen del caldo de cultivo.

15 caldo se filtró a través de un filtro prensa y el filtrado se lavó con acetato de etilo.

Después de eliminar la capa de acetato de etilo, la fase acuosa se concentró hasta 25.000 partes en volumen y después de ajustar el pH a 4,5 aproximadamente, se aplicó sobre una

20 columna de carbón activo. La columna se lavó con agua y metanol (solución acuosa al 40%) y después se eluyó la fracción activa.

El eluato se concentró obteniéndose unas 5 partes en peso de polvo que se disolvió en agua y aplicó sobre una columna de gel de sílice, y se eluyeron de la columna las fracciones

25 activas I y II con acetato de etilo-metanol (5:1). La fracción

413425



activa I se concentró para evaporar acetato de etilo y metanol,  
y se sometió a tratamiento en una columna de gel de sílice con  
un sistema disolvente de n-butanol-ácido acético-agua-acetato  
de butilo (30;1:1:30). Purificada de este modo, la fracción acti-  
5 va II se aplicó de nuevo sobre una columna de carbon activo.

La columna se lavó con metanol (solución  
acuosa al 50%) y el eluato se concentró a sequedad. El concentra-  
do se disolvió en un pequeño volumen de metanol y se mantuvo en re  
posito obteniéndose 0,09 partes en peso de agujas blancas.

10 Por otra parte, cuando la fracción activa  
II se trató de la misma manera que la fracción I, se separaron unas  
0,32 partes en peso de agujas blancas.

Se determinó que estos dos cristales eran,  
respectivamente, éster metílico de pepsinoestreptina-P y pepsinoes-  
15 treptina-P según sus análisis elementales, puntos de fusión, com-  
posiciones de amino ácidos, espectros de masas, etc.

La presente solicitud que corresponde a las  
presentadas en Japón, el 7 de Abril de 1.972, bajo el número  
35375/72 y el 7 de Julio de 1.972, bajo el número 68415/72, se aco-  
20 ge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Pro-  
piedad Industrial.



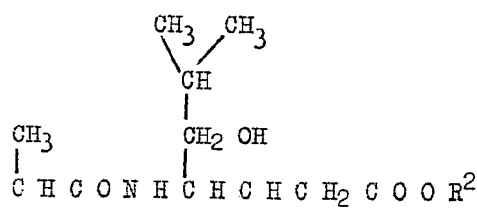
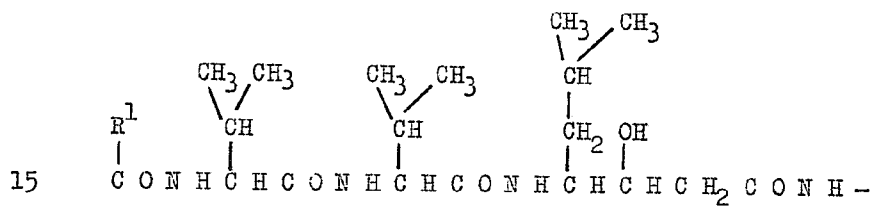
413425

111



(en donde R<sup>1</sup> es etilo o isopropilo y R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno o metilo), que comprende cultivar un microorganismo del género Streptomyces, capaz de acumular dicho inhibidor de proteasas, en un medio de cultivo que contiene una fuente de carbono asimilable y una fuente de nitrógeno digerible, bajo condiciones aerobias, hasta que el inhibidor de proteasas está sustancialmente acumulado en el caldo de cultivo, y recuperado de éste.

2<sup>a</sup>.- Un procedimiento según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que se añade al medio de cultivo valina, un derivado de valina acilado en el N, y/o ácido isobutírico, para mejorar la producción de un inhibidor de proteasas de fórmula



20 (en donde R<sup>1</sup> es isopropilo y R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno o metilo).

MS



413425

11 JUN 1973



Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de cuarenta y dos hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 11 JUN 1973

P.A.

Alberto de Eizburu  
Per Poder. *Alto*

3.6.73 FC

- 42 -

*MM*  
→



413425

413425

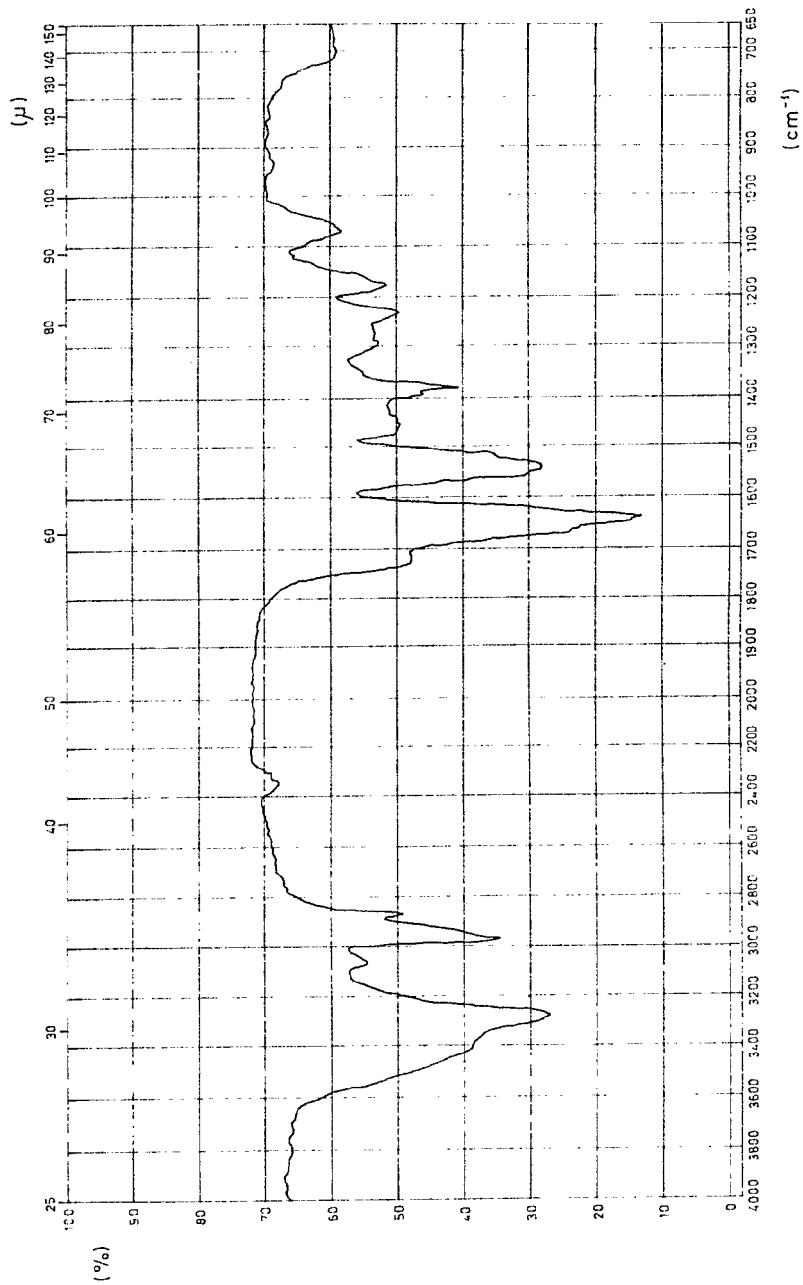


FIG.1

*Arta*

413425

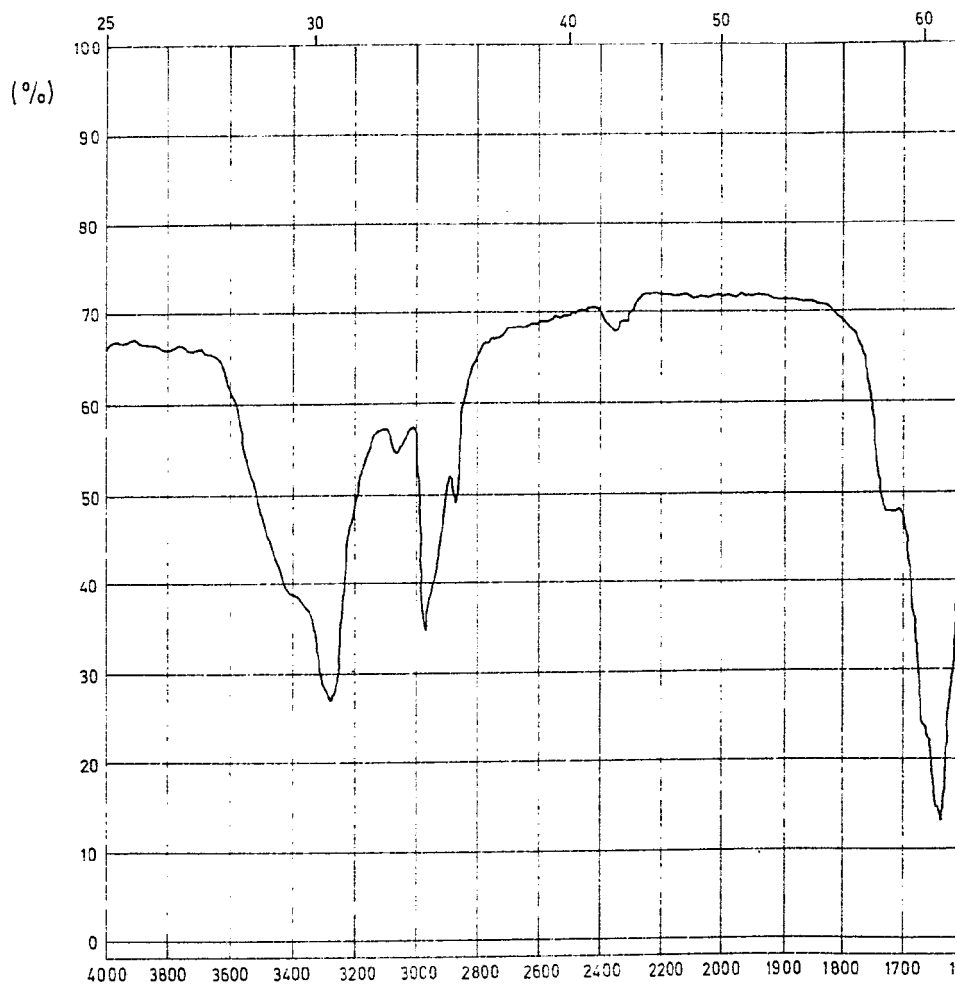


FIG.1



413425

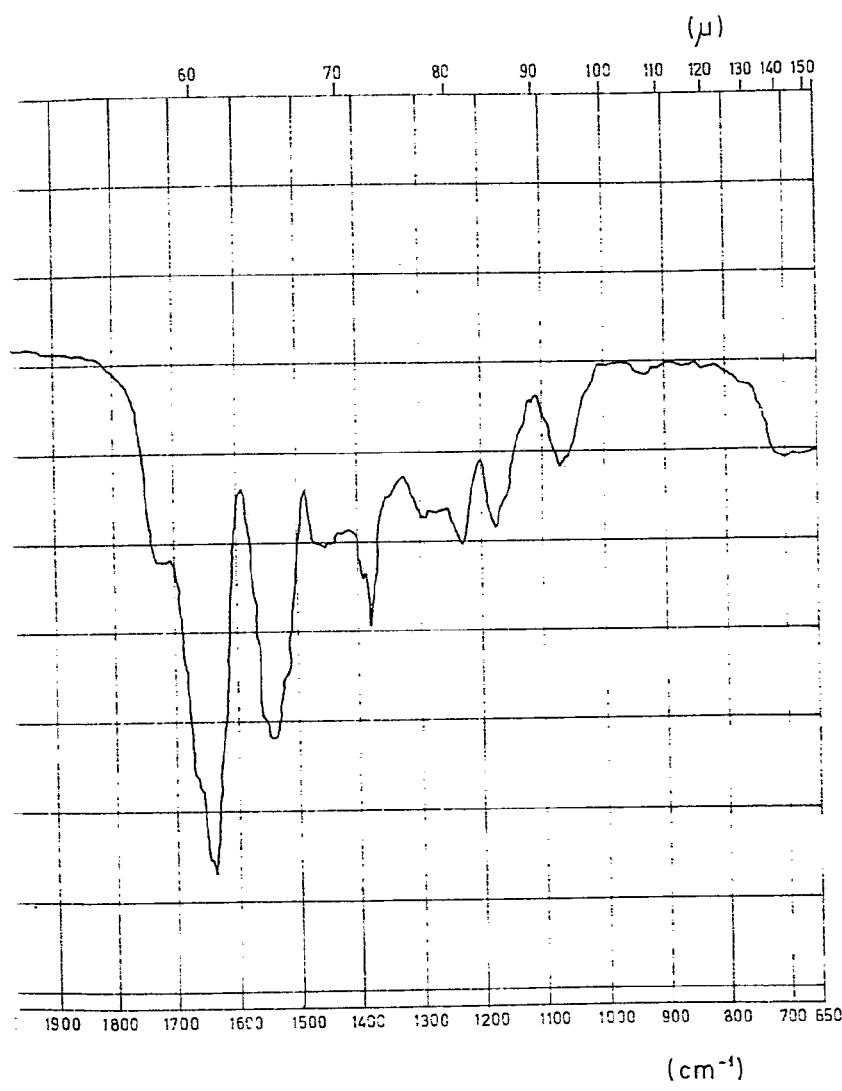


FIG.1

*Handwritten signature or initials.*

413425

413425

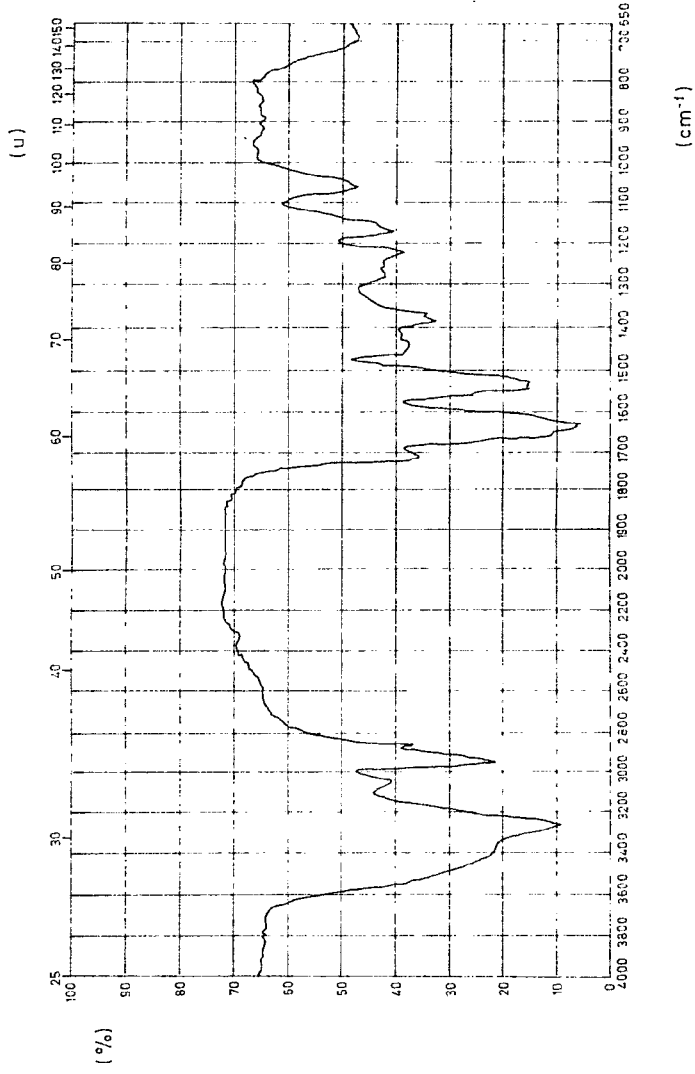


FIG.2

*Auth*

413425

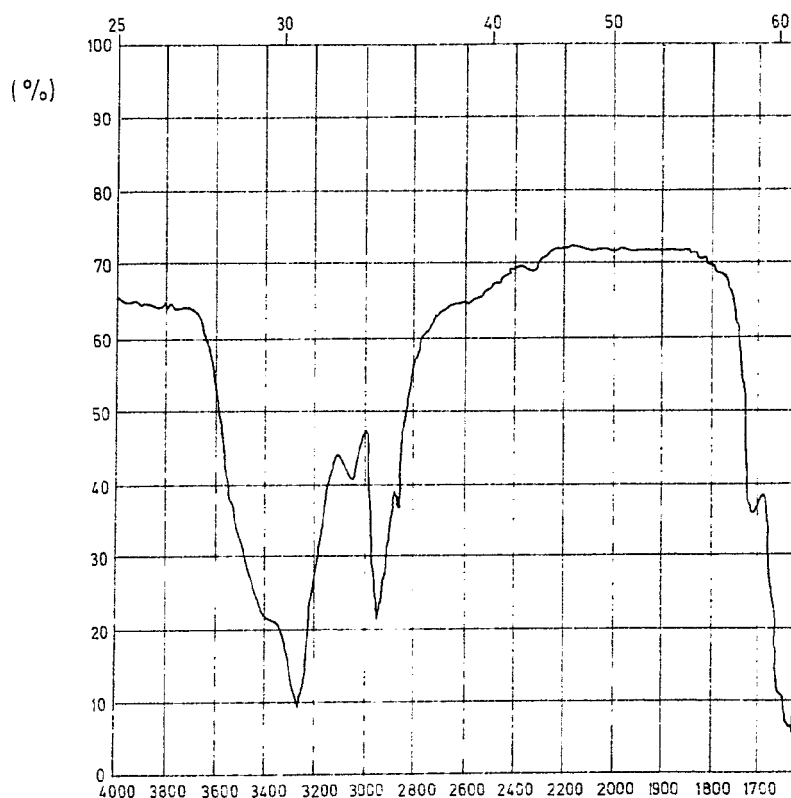


FIG. 2



413425

(u)

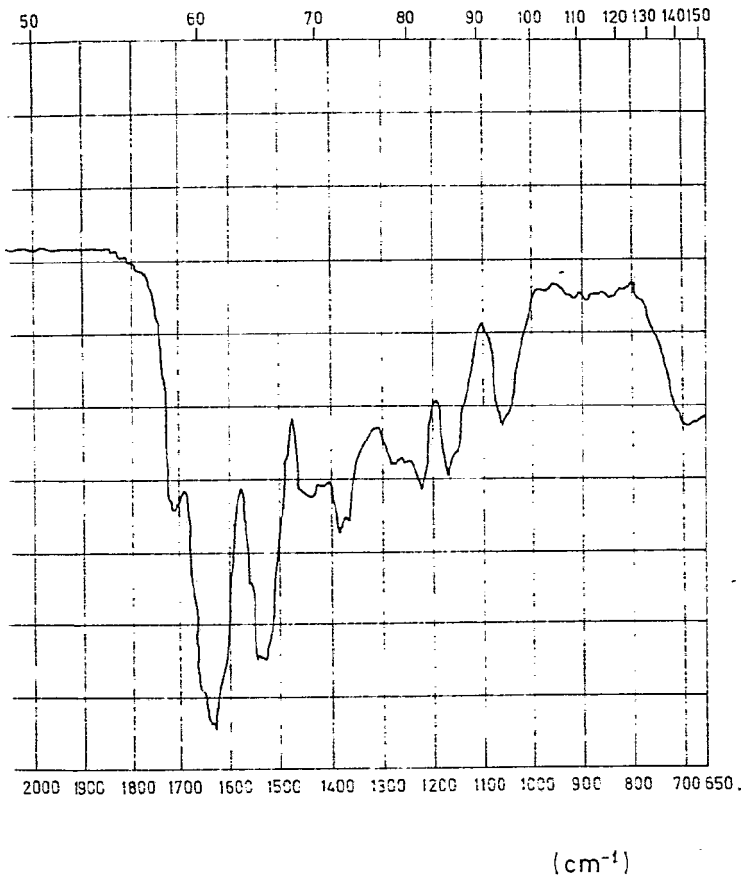


FIG. 2

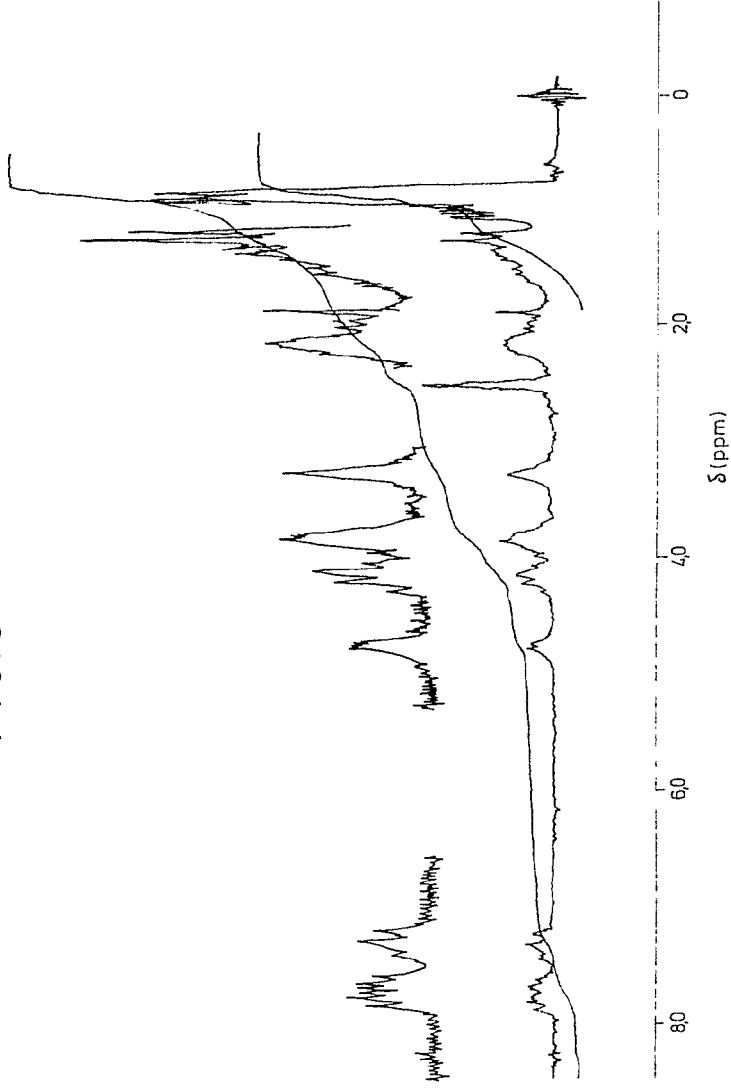
*Arthur*



413425

413425

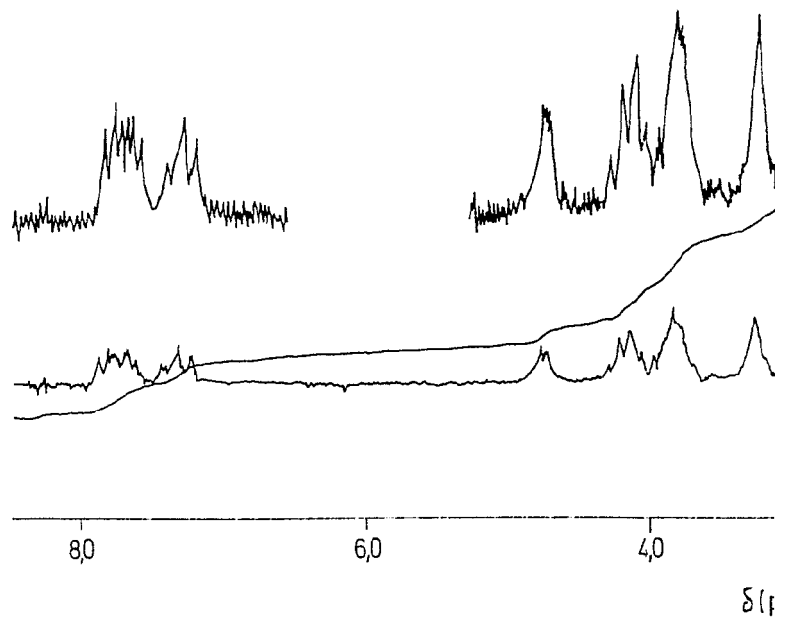
FIG.3



*Arler*

413425

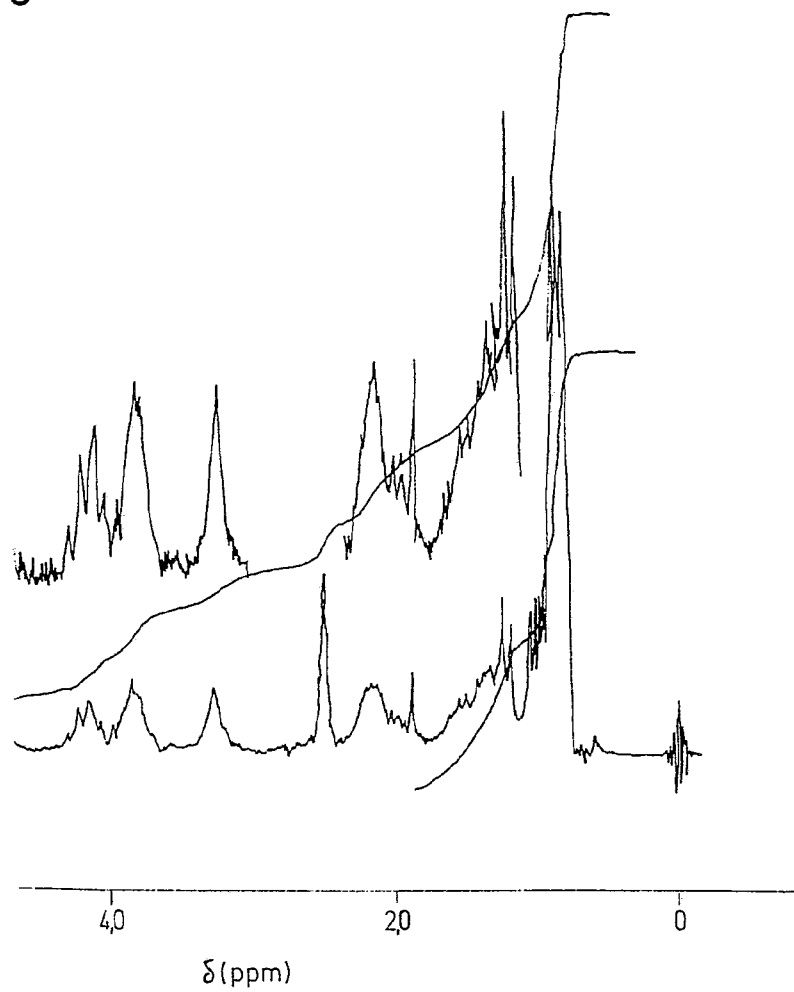
FIG.3





413425

3



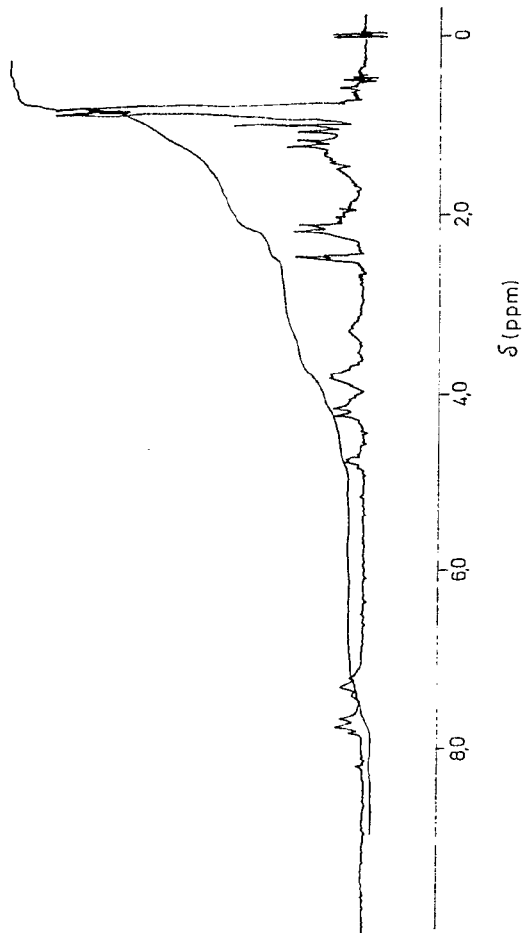
*Arler*



413425

413425

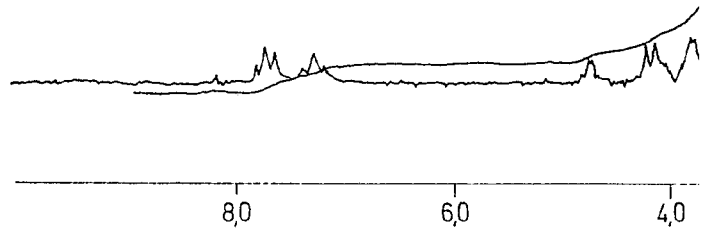
FIG.4

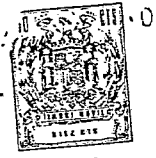


*Arta*

413425

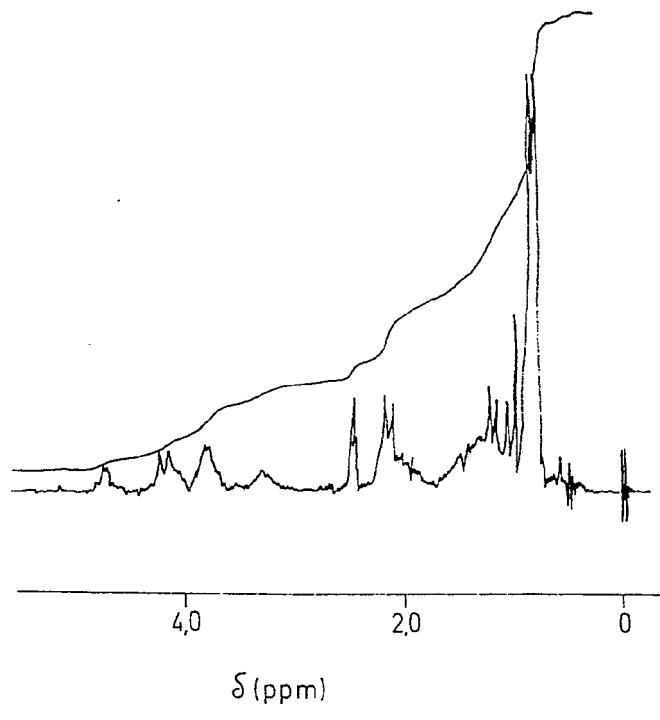
FIG.4





413425

FIG. 4



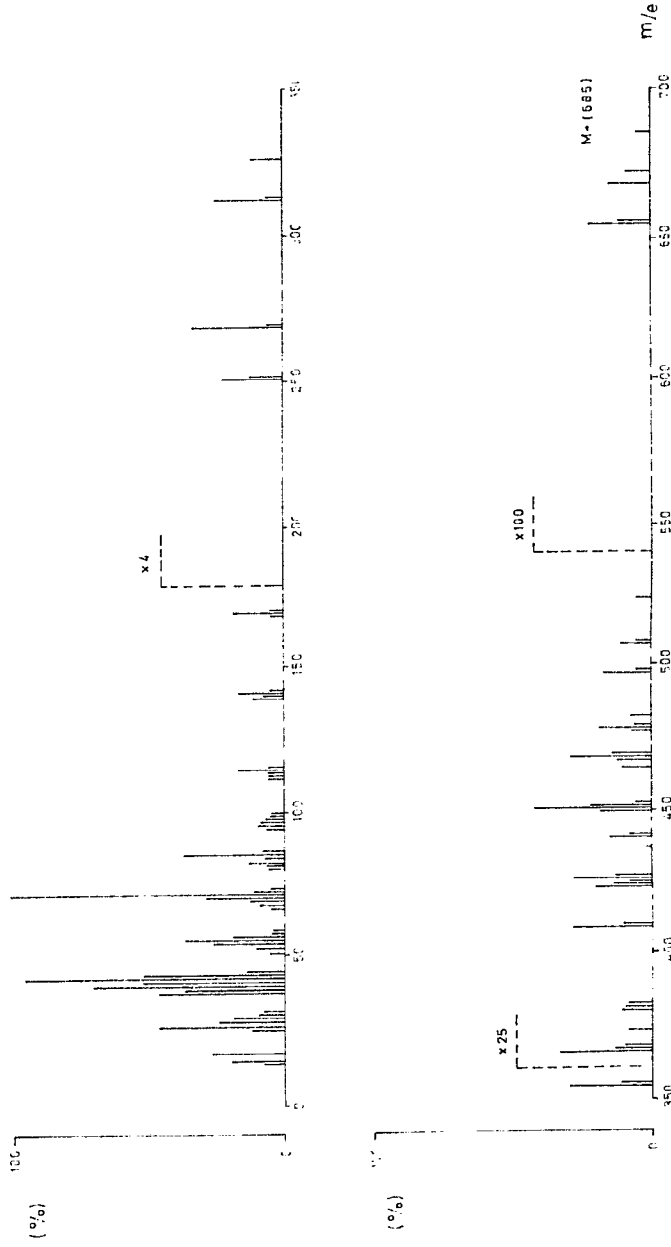
*Arta*



413429

413429

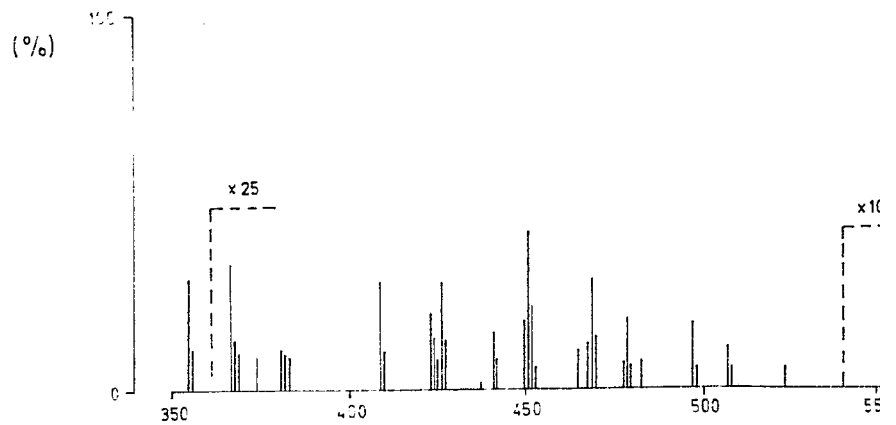
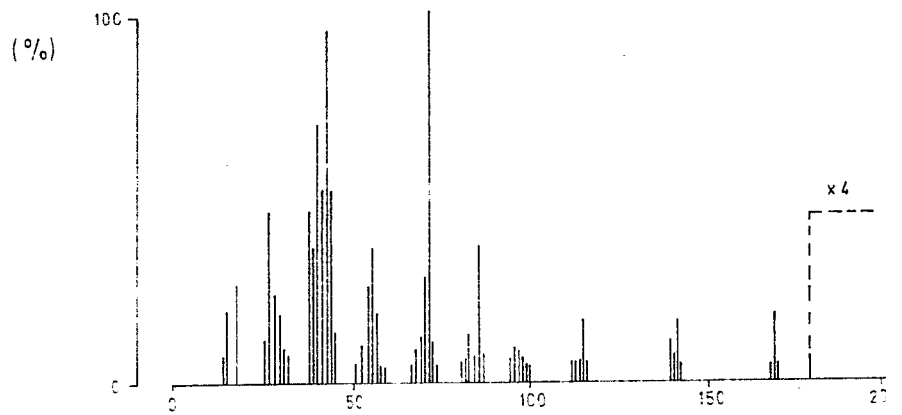
FIG.5



*Arka*

413425

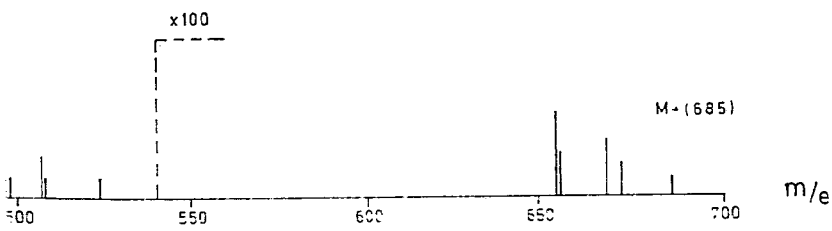
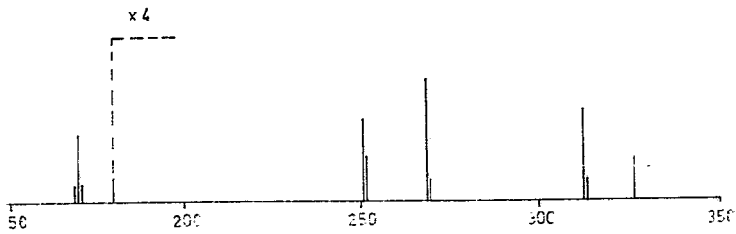
FIG. 5





413425

FIG. 5



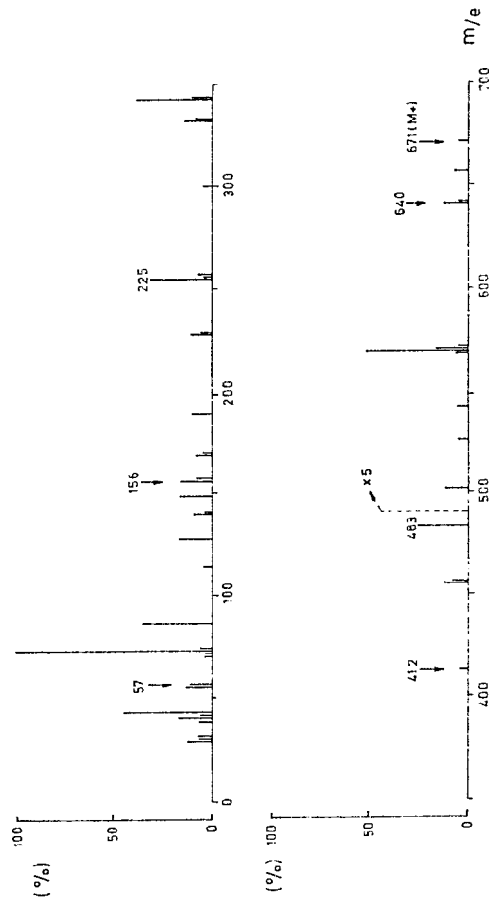
*Arka*



A1342

41342

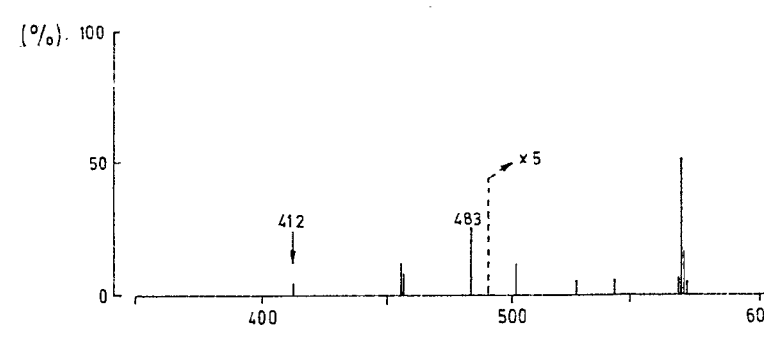
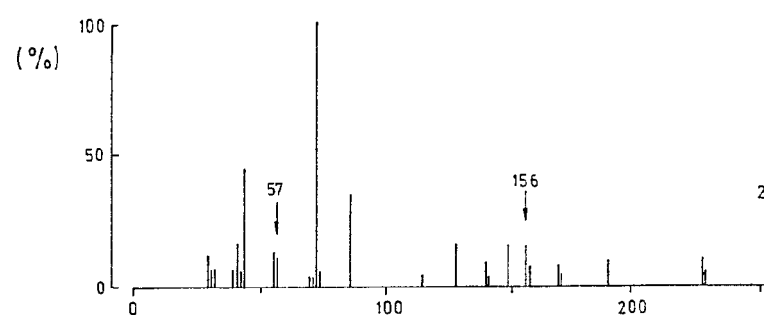
FIG.6



*Handwritten signature or initials.*

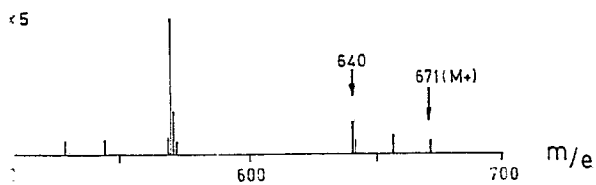
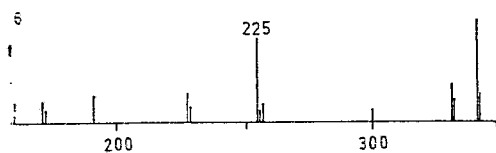
413429

FIG. 6

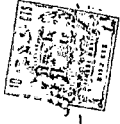


413425

G.6



*Anta*  
F30 F000000



413425

413

41342

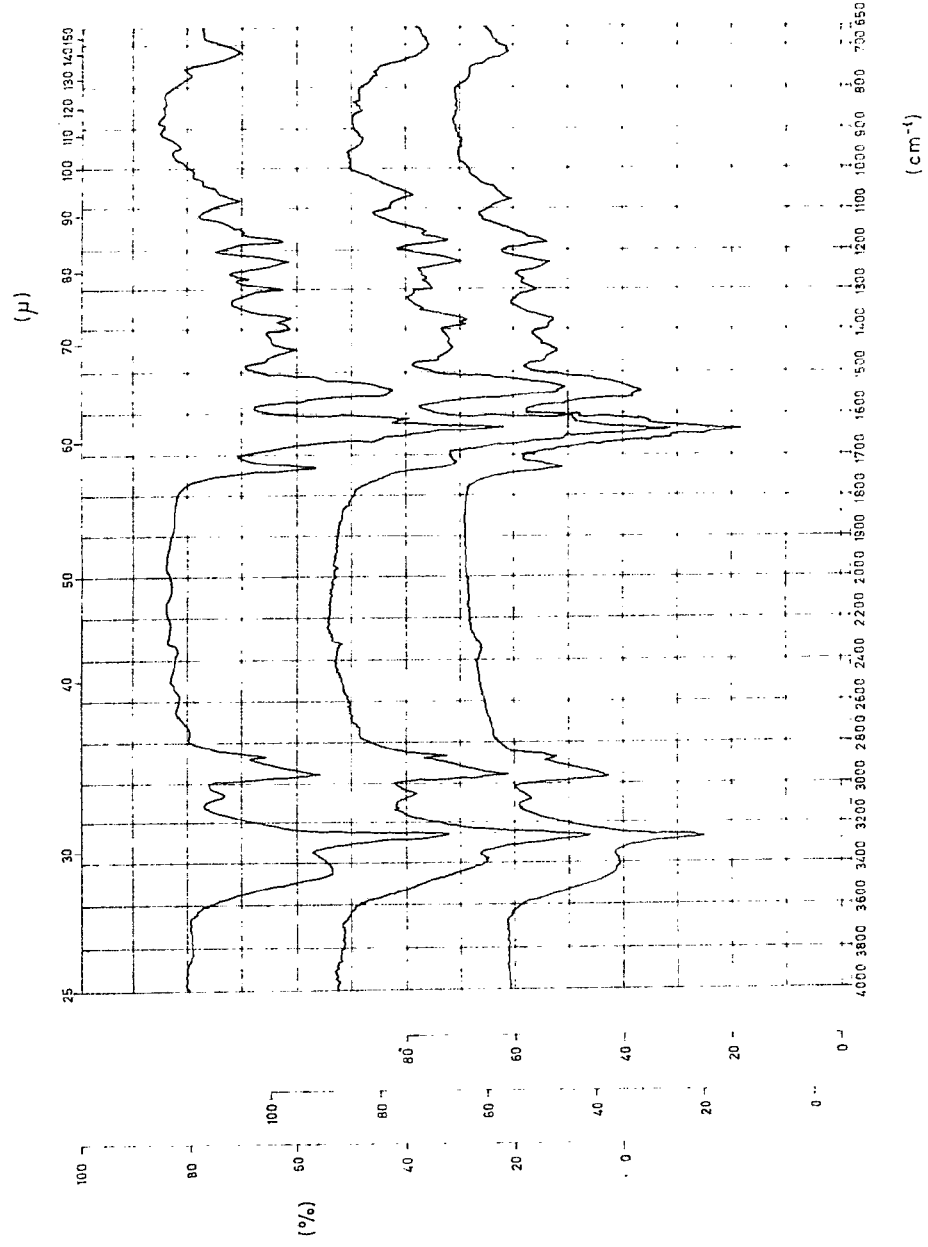


FIG.7

*Handwritten signature or initials*

41342<sup>5</sup>

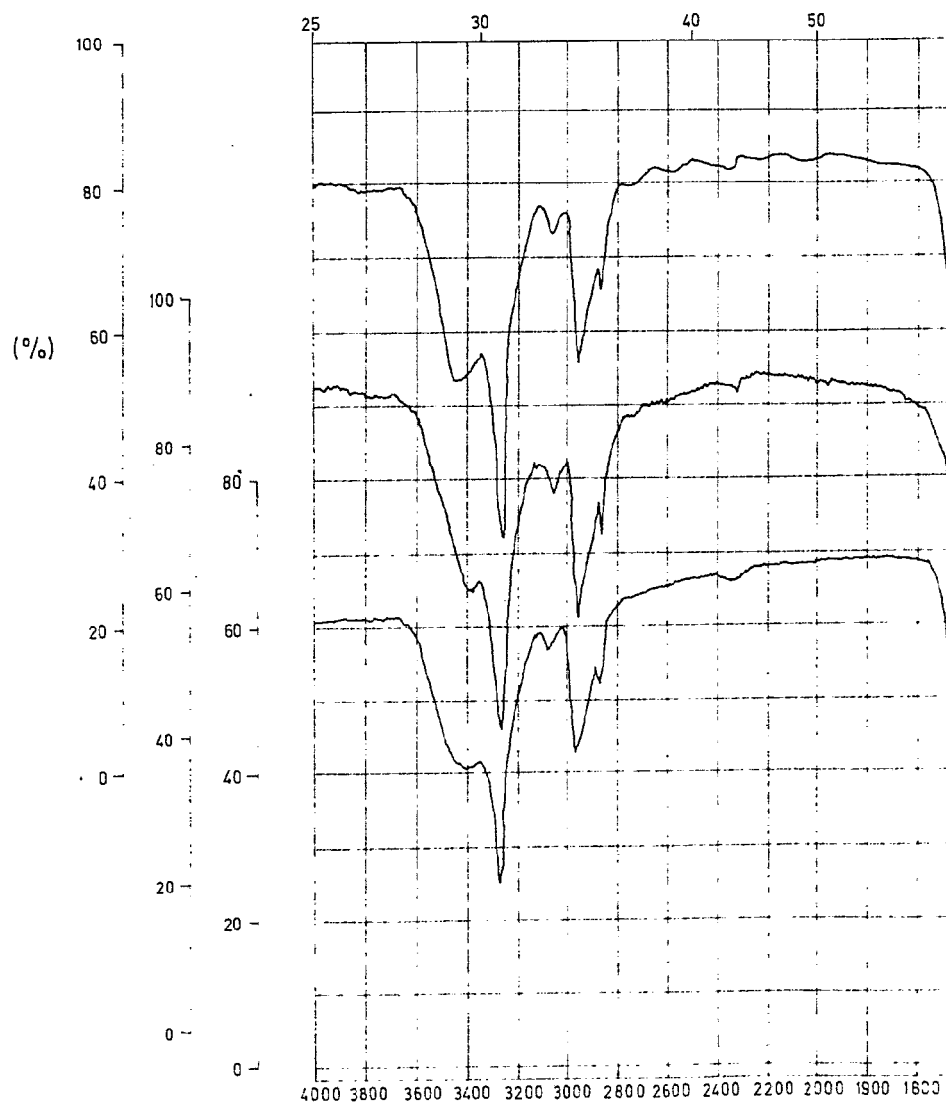


FIG.7

177  
10 25 675  
PUBLISHED BY  
PERIZ INC.

413425

413425

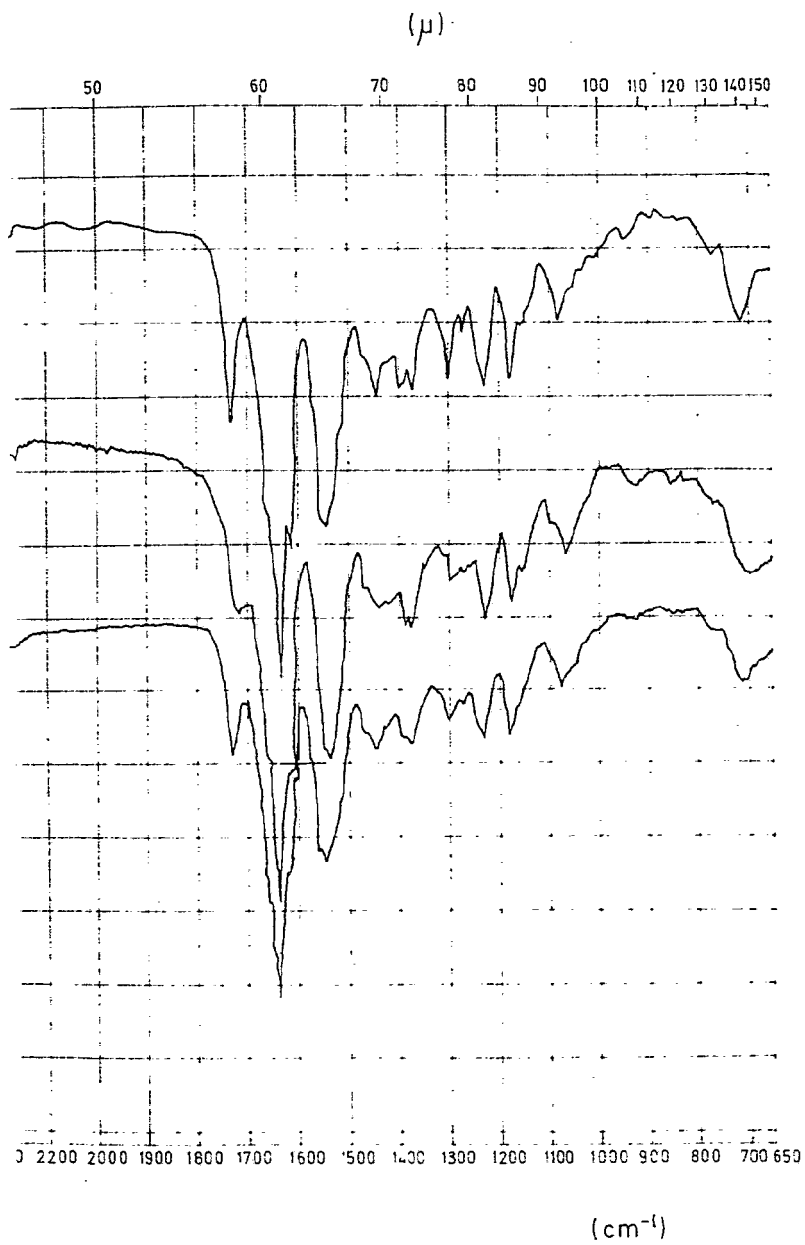


FIG. 7

Periz  
10/25/67  
*Periz*