

IN. -



Concedido el Registro de acuerdo con lo solicitado en la presente documentación y de acuerdo con el contenido de la Memoria adjunta.

**PATENTE DE INVENCION**

18 ES	11 NUMERO	10 A 1
21	468.457	
22	FECHA DE PRESENTACION	
	31-3-1.978	

30 PRIORIDADES	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMEROS		
SH052-88729	22-7-1.977	Japón

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07C	

64 TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN TETRAPEPTIDO.

71 SOLICITANTE (S)

ZAI DANHOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYUKAI

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

14-23, Kamiosaki 3-chome, Shinagawa-ku, Tokyo, JAPON

72 INVENTOR (ES)

Hamao Umezawa; Takaaki Aoyagi; Tomio Takeuchi y Masa Hamada, los cuales han cedido sus derechos a la entidad solicitante.

73 TITULAR (ES)

El mismo solicitante

74 REPRESENTANTE

DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

RESUMEN DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a nuevos péptidos fisiológicamente activos, a sus derivados y a un procedimiento para su preparación. En especial, se refiere a nuevos tetra péptidos denominados amastatinas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> y derivados de los mismos, que ejercen un efecto inhibitor sobre la aminopeptidasa A y también estimulan la formación de anticuerpos y a un procedimiento para su preparación por cultivo de una cepa perteneciente al género Streptomyces.

1. Campo de la Invención

Esta invención se refiere a nuevos péptidos fisiológicamente activos, a sus derivados y a un procedimiento para su preparación. En especial, se refiere a nuevos tetra péptidos denominados amastatinas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> y sus derivados, que ejercen un efecto inhibitor de la aminopeptidasa A y también estimulan la formación de anticuerpos y a un procedimiento para su preparación por cultivo de una cepa perteneciente al género Streptomyces.

2. Descripción de la técnica anterior

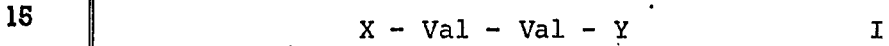
Se han encontrado varios péptidos o péptidos N-acilados fisiológicamente activos en los caldos de cultivo por parte de estos inventores. Estas sustancias, v.g. leupeptina, antipafina, chimostatina y pepstatina, inhiben la tripsina, la papaína, la chimotripsina y la pepsina, respectivamente, pero todos estos inhibidores ejercen efectos sobre las proteasas que actúan en una reacción de tipo endo. Para más detalles véase la obra Enzyme Inhibitors of Microbial Origin, Hamao Umezawa, University of Tokyo Press (1972), capítulo IV, Inhibitors of Proteolytic Enzymes (págs. 15-52) como sigue:

1	<u>Péptidos</u>	<u>Pág. n°</u>
	Leupeptina	15
	Antipafina	29
	Chimostatina	32
5	Pepstatina	34

La bestatina, que también se ha encontrado en un caldo de cultivo microbiano, inhibe una enzima proteolítica tipo exo, es decir, la aminopeptidasa B y la leucin-amino-peptidasa, pero no ejercen ningún efecto inhibitor sobre la aminopeptidasa A [J. Antibiotics 29, 97-103 y 600-601 y patente estadounidense 4.029.547].

COMPENDIO DE LA INVENCION

Esta invención proporciona los péptidos fisiológicamente activos amastatinas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> de fórmula I



donde

X representa un resto 3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanóilo o 3-amino-2-hidroxi-4-metilhexanóilo,

Val representa un resto de L-valilo e

20 Y representa ácido L-aspártico, ácido L-glutámico o α-amida del ácido L-aspártico cuando X es el resto 3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanóilo y ácido L-glutámico o α-amida de ácido L-glutámico cuando X es el resto 3-amino-2-hidroxi-4-metilhexanóilo y

25 el grupo amino de Val adyacente a X es acilado con el grupo carboxilo de X para formar una unión amida, el grupo carboxilo de dicho Val acila al grupo amino del otro Val para formar una unión amida y el grupo carboxilo del otro Val acila al grupo amino de Y para formar una unión amina.

30

1            Además, esta invención proporciona un procedimiento  
para la producción de amastatinas por cultivo de una nueva  
cepa de Streptomyces esp. recientemente aislada, ME98-M3  
5            (FERM p-3722), en un medio que contiene una fuente de carbo-  
no y una fuente de nitrógeno, en condiciones aerobias, has-  
ta que se ha producido una cantidad sustancial de actividad  
fisiológica y recuperación de las amastatinas así producidas  
del caldo de cultivo.

10            Esta invención también proporciona diversos deriva-  
dos de amastatina, como sales, ésteres o derivados N-acila-  
dos, que se preparan por procedimientos químicos convencio-  
nales.

15            Las amastatinas y sus derivados ejercen un potente  
efecto inhibitor de la aminopeptidasa A y aumentan la for-  
mación de anticuerpos. Por lo tanto, esta invención también  
proporciona un agente inhibitor de la aminopeptidasa A que  
contiene amastatinas y una composición para aumentar la  
formación de anticuerpos.

#### BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

20            Las Figuras 1, 2, 3, 4 y 5 presentan los espectros  
de absorción infrarroja en KBr de las amastatinas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>,  
A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, respectivamente.

25            Las Figuras 6, 7, 8, 9 y 10 muestran los espectros  
de RMN (100 MHz en D<sub>2</sub>O) de las amastatinas en el mismo  
orden indicado anteriormente, respectivamente.

30            Las Figuras 11, 12, 13, 14 y 15 muestran los espec-  
tros de masas de los ésteres dimetílicos de N-acetilamasta-  
tina de las amastatinas en el mismo orden indicado anterior-  
mente, respectivamente.

1

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Las amastatinas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> de esta invención están relacionadas entre sí estructuralmente. Tienen propiedades fisicoquímicas similares como puntos de fusión, análisis elemental, pK<sub>a</sub>, valores de R<sub>f</sub> en cromatografía en capa fina y migraciones en electroforesis de papel a alto voltaje que están resumidos en la Tabla I.

5

TABLA I

Propiedades fisicoquímicas de las amastatinas

10

	<u>Amastatinas</u>				
	<u>A<sub>1</sub></u>	<u>A<sub>2</sub></u>	<u>A<sub>3</sub></u>	<u>B<sub>1</sub></u>	<u>B<sub>2</sub></u>
P.f. °C	200-203	202-205	196-200	195-197	196-200
Análisis elemental					
Encontrado, %					
C	53,06	53,00	54,30	54,00	54,31
H	8,32	7,91	8,01	8,40	7,98
O	14,61	27,17	11,16	23,02	11,21
N	23,30	11,67	26,10	14,18	26,00
Calculado, %					
C	53,26	53,15	54,08	54,19	54,08
H	8,30	8,07	8,25	8,48	8,25
O	14,79	11,81	11,47	22,97	11,47
N	23,65	26,98	26,20	14,36	26,20
Para	C <sub>21</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> - C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> - C <sub>22</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> - C <sub>22</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> - C <sub>22</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>				
Peso molecular	473	474	488	487	488
pK <sub>a</sub>					
	3,8	2,8	3,0	3,7	3,0
		4,0	4,2		4,2

15

20

25

30

TABLA I (continuación)

	<u>A<sub>1</sub></u>	<u>A<sub>2</sub></u>	<u>A<sub>3</sub></u>	<u>B<sub>1</sub></u>	<u>B<sub>2</sub></u>
Valor R <sub>f</sub> *	0,47	0,46	0,54	0,55	0,52
Valor R <sub>m</sub> **	0,52	0,51	0,53	0,54	0,53

\* La cromatografía en capa fina se realizó con una placa de gel de sílice y un sistema disolvente de n-butanol/ácido acético/agua (4:1:1)

\*\* Distancia relativa de migración hacia un cátodo respecto a la alanina con una solución tampón de ácido fórmico/ácido acético/agua (25:75:900) a 3500 V durante 15 minutos.

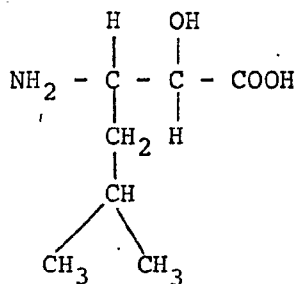
Las amastatinas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> son solubles en agua, metanol, ácido acético, piridina y dimetilsulfóxido; ligeramente solubles en n-propanol y n-butanol y casi insolubles en acetato de etilo, acetato de butilo, éter dietílico, n-hexano, éter de petróleo, benceno y cloroformo. Dan reacciones positivas de Rydon-Smith, con ninhidrina y con permanganato potásico pero reacciones negativas de Ehrlich y Sakaguchi. No se observa ningún espectro de absorción ultravioleta característico. Las amastatinas son estables en soluciones neutras, ácidas y alcalinas. La actividad inhibidora de la aminopeptidasa A no disminuye al calentar la solución acuosa de pH 2, 7 o 9 a 60°C durante 30 minutos.

A continuación se describen las estructuras de las amastatinas que hasta ahora han sido caracterizadas.

Amastatina A<sub>1</sub>:

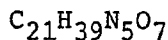
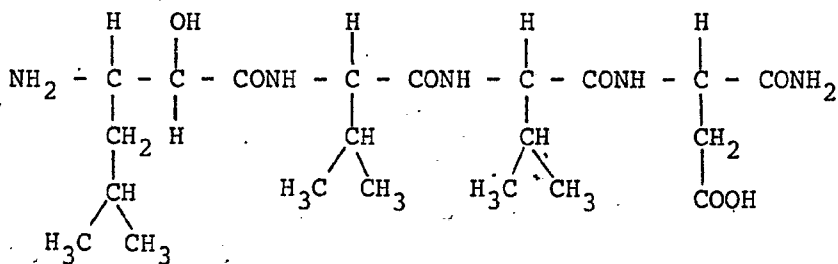
En el espectro de absorción infrarrojo (Figura 1) en bromuro potásico, se observan los siguientes picos de absorción: 3300, 2980, 1710, 1665, 1635, 1550, 1470, 1405, 1355, 1225, 1150, 1090 y 700 cm<sup>-1</sup>. El análisis de aminoácidos del hidrolizado ácido del compuesto en HCl 6N a 105°C durante 18 horas da valina, ácido aspártico y un aminoácido anteriormente desconocido con una relación molar de 2:1:1.

1 El nuevo aminoácido es aislado y purificado por cromatografía  
5 en resina; el espectro de RMN, el espectro IR, el análisis elemental, el valor de  $pK_a$ , las reacciones coloreadas y las reacciones químicas sugieren que su estructura es la siguiente, confirmada por síntesis química:



Acido 3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanoico.

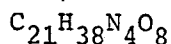
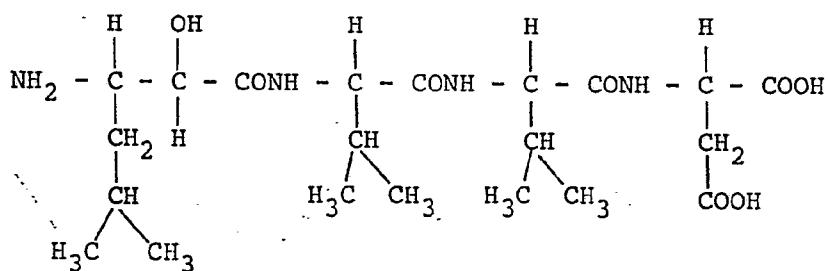
15 El espectro de RMN (100 MHz en  $D_2O$ ) de la amastatina  $A_1$  (Figura 6) presenta señales a  $\delta$  1,1-1,4, 1,6-2,1, 2,2-2,6, 3,0-3,2, 3,85-3,95 y 4,4-4,7. Para mejor caracterización, el péptido se acetila en el nitrógeno terminal y el éster dimetílico de N-acetilamastatina  $A_1$  se somete a análisis de masas (Figura 11). El resultado revela que estos aminoácidos están enlazados por uniones amida en la secuencia: nuevo aminoácido N-acetilado, L-valina, L-valina y éster dimetílico de ácido L-aspártico a partir del N terminal. El valor de 3,8 antes indicado para el  $pK_a$  indica que el grupo  $\beta$ -carboxilo del ácido aspártico en el C terminal del péptido está libre y el otro grupo  $\alpha$ -carboxilo forma una amida. Por lo tanto, se ha determinado que la estructura de la amastatina  $A_1$  es la siguiente:



1  $\alpha$ -amida de ácido 3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanoil-L-valil-L-valil-L-aspartico

Amastatina A<sub>2</sub>:

5 El espectro IR (KBr) (Figura 2) da los siguientes picos: 3400, 3250, 3030, 2930, 1700, 1650, 1620, 1530, 1465, 1390, 1220, 1160, 1085 y 700 cm<sup>-1</sup>. El análisis de aminoácidos da los mismos resultados que la amastatina A<sub>1</sub>. También se ha identificado que el nuevo aminoácido es igual al de la amastatina A<sub>1</sub>, por los procedimientos antes mencionados. En el espectro de RMN de la amastatina A<sub>2</sub> (Figura 7) se observan señales a  $\delta$  1,2-1,5, 1,9-2,1, 2,3-2,7, 3,15-3,35, 3,95-4,15, 4,5-4,8 y 4,9-5,1. El análisis espectrométrico de masas de alta resolución (Figura 12) del éster dimetílico de la N-acetilamastatina indica la misma secuencia de aminoácidos que en la amastatina A<sub>1</sub>. El análisis elemental y los valores de 2,8 y 4,0 del pK<sub>a</sub>, sin embargo, indican que los dos grupos carbonilo del ácido aspártico son ácido carboxílico. La estructura determinada es la siguiente:

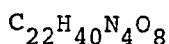
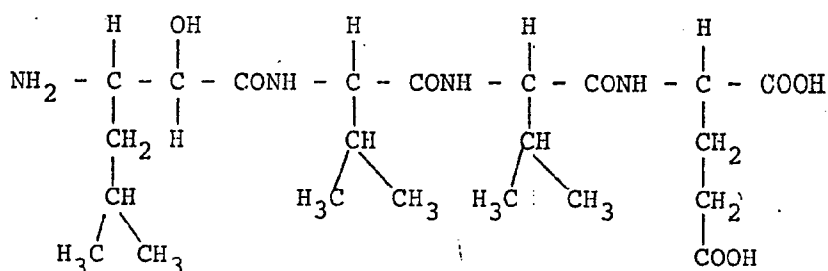


ácido 3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanoil-L-valil-L-valil-L-aspartico.

Amastatina A<sub>3</sub>:

30 El espectro IR (KBr) (Figura 3) del compuesto tiene los siguientes picos: 3430, 3280, 2950, 1710, 1660, 1630, 1540, 1467, 1395, 1225, 1090, 960 y 700 cm<sup>-1</sup>. El análisis de amino

1 ácido del hidrolizado ácido da valina, ácido glutámico y  
 un aminoácido desconocido. Se ha identificado que el nuevo  
 aminoácido es igual al de A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>. El espectro de RMN de  
 5 la amastatina A<sub>3</sub> (Figura 8) presenta las señales a δ 1,2-1,6,  
 2,3-2,7, 2,7-3,0, 3,1-3,4, 3,8-4,4 y 4,4-4,9. El espectro  
 de masas de alta resolución (Figura 13) del éster dimetílico  
 de la N-acetil-amastatina A<sub>3</sub> indica que el nuevo aminoácido  
 N-acetilado, valina, valina y éster dimetílico de ácido glu-  
 10 támico están enlazados en ese orden a partir del N-terminal  
 formando uniones amida. Los valores de 3,0 y 4,2 para el  
 pK<sub>a</sub> sugieren que los grupos α- y γ-carbonilo del ácido glu-  
 támico son ácido carboxílico. De estos resultados se deduce  
 que la estructura de la amastatina A<sub>3</sub> es la siguiente:

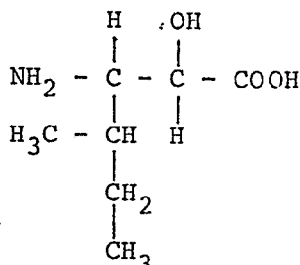


ácido 3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanoil-L-valil-L-valil-L-  
 glutámico.

Amastatina B<sub>1</sub>:

25 En el espectro IR (Figura 4) aparecen las siguientes ban-  
 das de absorción: 3340, 3000, 1710, 1665, 1640, 1550, 1475,  
 1405, 1315, 1230, 1160, 1090, 960 y 700 cm<sup>-1</sup>. El análisis  
 de aminoácidos del hidrolizado ácido de la amastatina B<sub>1</sub> en  
 HCl 6N a 105°C durante 18 horas da valina, ácido glutámico  
 y un aminoácido desconocido, en una relación molar de 2:1:1.  
 30 El nuevo aminoácido ha sido aislado, purificado y caracteri-  
 zado por análisis de RMN. Se ha hallado que la estructura

1 del aminoácido es la siguiente por síntesis química:



5

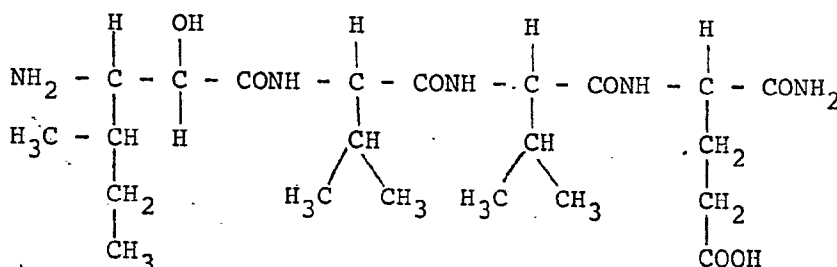
ácido 3-amino-2-hidroxi-4-metilhexanoico

10

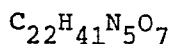
La amastatina B<sub>1</sub> da un espectro de RMN (100 MHz en D<sub>2</sub>O) (Figura 9) que presenta las señales a δ 0,6-1,0, 1,2-1,55, 1,6-2,3, 2,95-3,3, 3,8-4,4, 7,4-7,7 y 7,9-8,3. El análisis del espectro de masas de alta resolución (Figura 14) del éster dimetílico de la N-acetil-amastatina B<sub>1</sub> indica que el nuevo aminoácido N-acetilado, valina, valina y éster dimetílico de ácido glutámico están ligados por uniones amida en la secuencia mencionada. El valor de 3,7 para el pK<sub>a</sub> sugiere que el grupo γ-carbonilo del ácido glutámico unido al carbono terminal lateral es ácido carboxílico y el otro grupo α-carboxilo es una amida. Por lo tanto, se ha determinado que la estructura de la amastatina B<sub>1</sub> es la siguiente:

15

20



25



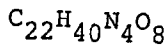
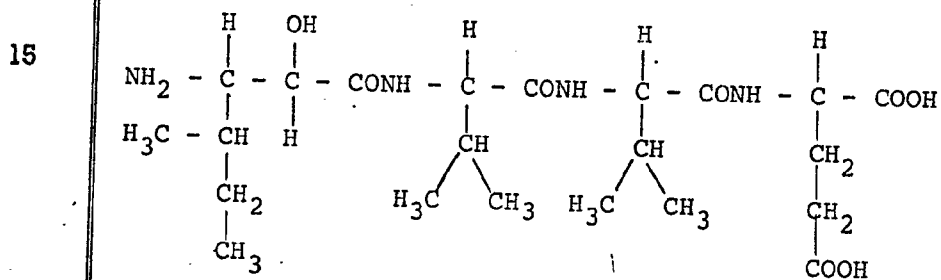
α-amida del ácido 3-amino-2-hidroxi-4-metilhexanoil-L-valil-L-valil-L-glutámico.

Amastatina B<sub>2</sub>:

30

En el espectro IR (Figura 5) se observan los siguientes máximos de absorción: 3400, 3260, 2940, 1700, 1655, 1625,

1 1550, 1450, 1400, 1315, 1225, 1150, 1090, 950 y 700  $\text{cm}^{-1}$ .  
Se detectan los mismos tres aminoácidos que en la amastatina  $B_1$ . El espectro de RMN (100 MHz en  $D_2O$ ) (Figura 10) presenta las señales a  $\delta$  1,1-1,55, 2,1-2,35, 2,37-2,75, 2,8-3,2  
5 3,8-4,05, 4,45-4,7, 4,75-4,9 y 4,9-5,0. Los datos del espectro de masas de alta resolución (Figura 15) del éster dimetílico de la amastatina  $B_2$  N-acetilada revelan que el nuevo aminoácido N-acetilado, dos valinas y el éster dimetílico de ácido glutámico están combinados en esta secuencia por uniones amida. Los valores de 3,0 y 4,2 para el  $pK_a$  indican que los dos grupos carbonilo del ácido glutámico son ácido carboxílico. La estructura de la amastatina  $B_2$  es la siguiente:

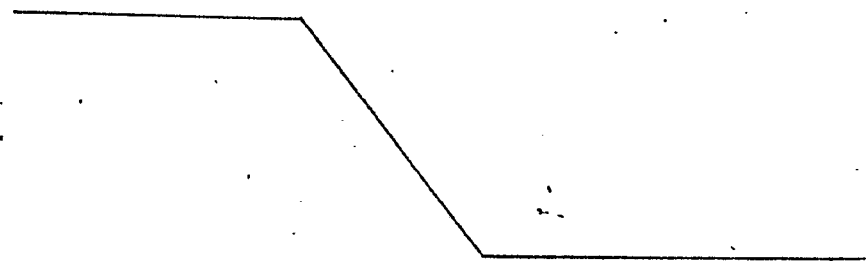


ácido 3-amino-2-hidroxi-4-metilhexanoil-L-valil-L-valil-L-glutámico.

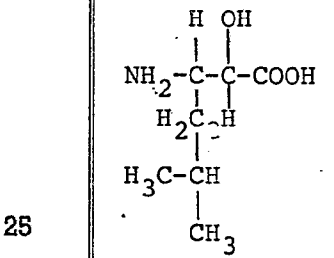
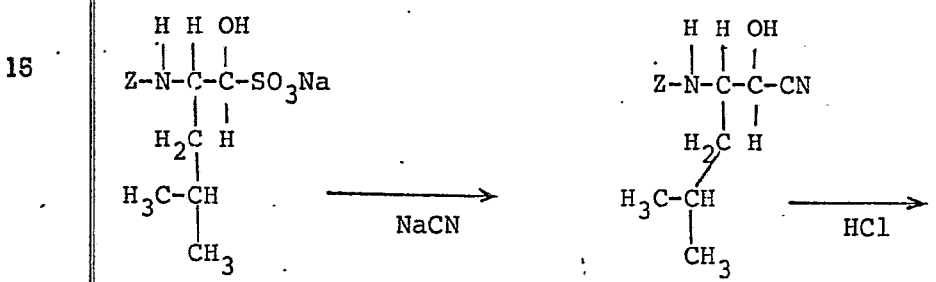
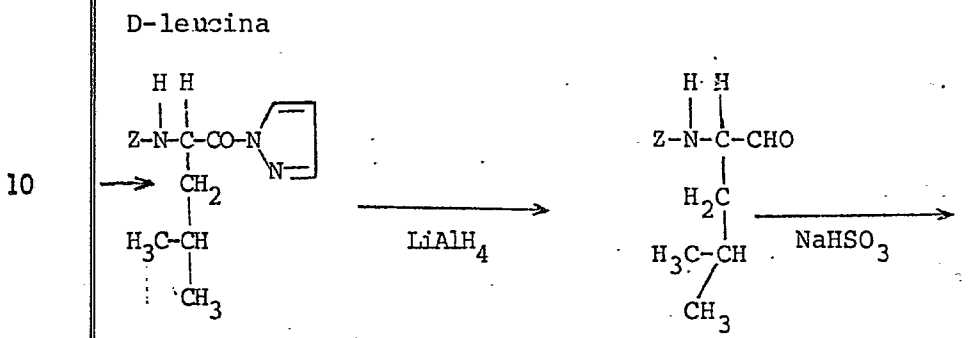
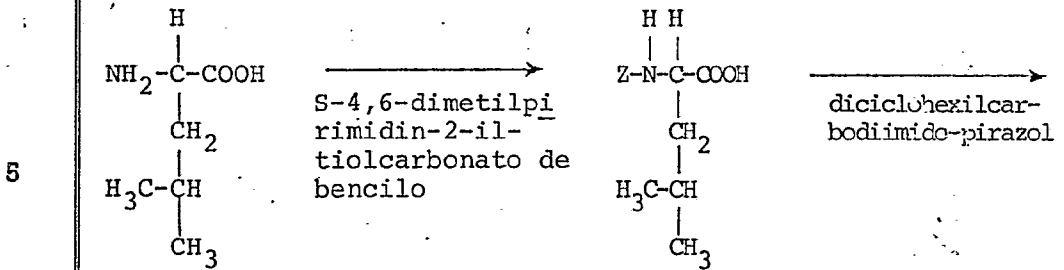
Para confirmar las estructuras de las amastatinas antes mencionadas, los nuevos péptidos fueron sintetizados químicamente de acuerdo con el siguiente esquema:

25

30



1 Síntesis del nuevo aminoácido de la amastatina



ácido 3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanoico

Z representa carbobenzoxi.

El ácido 3-amino-2-hidroxi-4-metilhexanoico se obtiene de la misma manera a partir de D-isoleucina.

1

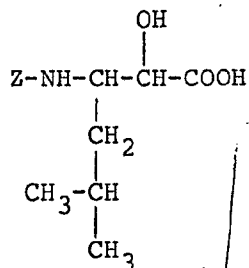
Síntesis química de la amastatina

5

D-leucina



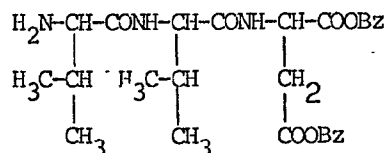
Acido 3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanoico



L-valina, ácido L-aspartico



síntesis convencional de péptidos en fase líquida

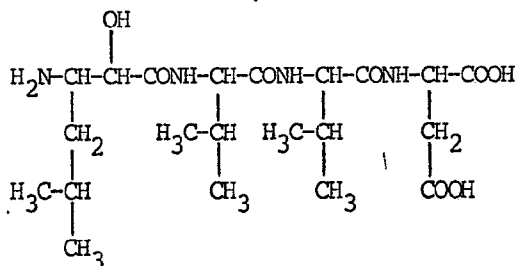


10

reacción convencional de copulación



15



20

ácido 3-amino-2-hidroxi-5-metilhexanoil-L-valil-L-valil-L-aspartico.

Otros análogos se sintetizan por el mismo esquema empleando isoleucina o ácido glutámico.

25

Las propiedades fisicoquímicas de las amastatinas obtenidas por el procedimiento de esta invención concuerdan bien con las de los péptidos químicamente sintetizados. Por lo tanto, las estructuras antes mencionadas de las amastatinas han sido confirmadas.

30

Las amastatinas contienen un grupo amino y un grupo carboxilo en los casos de las amastatinas A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub> y B<sub>1</sub> y un gru-

1 po amino y dos grupos carboxilo en los casos de las amasta-  
tinas A<sub>2</sub> y B<sub>2</sub>, que son capaces de formar sales, ésteres y  
derivados acilados por métodos convencionales. Por lo tanto,  
esta invención incluye estos derivados de amastatina.

5 Otro aspecto de esta invención es proporcionar un pro-  
cedimiento para la preparación de las amastatinas que consis-  
te en cultivar una cepa productora de amastatina pertenecien-  
te al género Streptomyces en un medio adecuado que contiene  
una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, en condicio-  
10 nes aerobias, hasta que se producen cantidades sustanciales  
de amastatinas en el caldo de cultivo y recuperar las amas-  
tatinas así producidas por métodos convencionales.

El microorganismo útil para la preparación de las amas-  
tatinas ha sido taxonómicamente caracterizado como Streptomyces  
15 sp. ME 98-M3. Fue aislado de una tierra como cepa ME 98-M3  
y depositado en el Instituto de Investigación sobre Fermenta-  
ciones, Japón con la designación FERM p-3722 y en la American  
Type Culture Collection, Rockville, Maryland, como ATCC  
20 31318. Las características morfológicas y de cultivo de la  
cepa están indicadas en los siguientes párrafos:

1. Morfología

Hifas aéreas con terminales curvados o en forma de rizo  
que se extienden desde hifas de substrato ramificadas. La ca-  
25 dena de esporas maduras contiene 10 y más esporas, de 0,6-  
0,8 x 1,0-1,2 micras, con superficies lisas.

2. Crecimiento en varios medios

La descripción entre paréntesis responde al patrón de  
colores "Color Harmony Manual" publicado por la Container  
30 Corporation of América, Estados Unidos.

1

a) Agar sacarosa-nitrato

Crecimiento vegetativo: amarillo oscuro (ambar 3mc), sin pigmento soluble

5

Micelio aéreo : blanco (a, blanco) a pardo amarillento pálido (1 1/2 gc, amarillo polvoriento)

b) Agar glucosa-asparagina

Crecimiento vegetativo: pardo amarillento (3 ne, bombón escocés topacio). Sin pigmento soluble

10

Micelio aéreo : gris pálido (3 fe, gris plata).

c) Agar glicerina-asparagina (Medio ISP n° 5)

Crecimiento vegetativo: pardo amarillento (3 ne, bombón escocés topacio). Sin pigmento soluble

15

Micelio aéreo : gris pálido (3 fe, gris plata)

d) Agar almidón-sales inorgánicas (Medio ISP n° 4)

Crecimiento vegetativo: amarillo oscuro (2 ne, oro mostaza) a amarillo pálido (2 ne, oro viejo). Sin pigmento soluble

20

Micelio aéreo : gris amarillento (2 ea, trigo pálido a maíz pálido)

e) Agar tirosina (Medio ISP n° 7)

Crecimiento vegetativo: pardo amarillento grisáceo (3 ni, marrón clavo). Sin pigmento soluble

25

Micelio aéreo : blanco grisáceo (b, blanco ostra) a gris amarillento (2 ca, marfil pálido)

30

- 1 f) Agar nutriente  
Crecimiento vegetativo: pardo amarillento pálido (3 pe,  
topacio ambarino). Sin pigmento  
soluble
- 5 Micelio aéreo : ninguno
- g) Agar extracto de malta-extracto de levadura (Medio ISP n°2)  
Crecimiento vegetativo: naranja amarillento oscuro (3 pg,  
marrón dorado). Sin pigmento so-  
luble
- 10 Micelio aéreo : blanco (a, blanco)
- h) Agar harina de avena (Medio ISP n° 3)  
Crecimiento vegetativo: amarillo oscuro (2 nc, oro brillan-  
te a oro pepita). Sin pigmento so-  
luble
- 15 Micelio aéreo : gris amarillento (2 ca, marfil  
pálido)
- i) Agar peptona-extracto de levadura-hierro (Medio ISP n° 6)  
Crecimiento vegetativo: incoloro a marrón amarillento pá-  
lido (2 ga, amarillo colonial,  
maíz). Sin pigmento soluble
- 20 Micelio aéreo : ninguno
- j) Agar malato cálcico  
Crecimiento vegetativo: incoloro a amarillo pálido (1 1/2  
ia, amarillo solar, narciso, for-  
sítia, junquillo). Sin pigmento  
soluble
- 25 Micelio aéreo : blanco (a, blanco).

Todas las observaciones mencionadas se realizaron des-  
pués de incubar a 27°C.

1 3. Propiedades fisiológicas

(a) Temperatura de crecimiento: la temperatura óptima para el crecimiento es 24-30°C en agar maltosa-extracto de levadura (maltosa 10,0 g, extracto de levadura 4,0 g, agar 17,0 g y agua desionizada 1000 ml, pH 7,0). No hay crecimiento por debajo de 15°C y por encima de 45°C.

5 (b) Licuefacción de la gelatina sobre un medio de glucosa-peptona-gelatina a 27°C. La licuefacción comienza al cabo de 5 días de incubación y es completa a los 21 días. Licuefacción débil.

10 (c) Hidrólisis del almidón sobre agar almidón-sales inorgánicas (Medio ISP n° 4) a 27°C: comienza una hidrólisis muy débil al cabo de unos 5 días de incubación.

15 (d) Peptonización y coagulación de la leche descremada a 37°C: la coagulación es completa al cabo de 4 días de incubación y después comienza una peptonización moderada.

(e) Formación de melamina sobre caldo de triptona-extracto de levadura (Medio ISP n° 1), agar peptona-extracto de levadura-hierro (Medio ISP n° 6) y agar tirosina (Medio ISP n° 7) a 27°C: negativo en todos los medios

20 (f) Utilización de hidratos de carbono del agar Pridham-Gottlieb a 27°C: L-arabinosa, xilosa, glucosa, D-fructosa, sacarosa, inositol y rafinosa: buen crecimiento; L-ramnosa y celulosa: no hay crecimiento

25 (g) Licuefacción del malato cálcico sobre agar malato cálcico a 27°C: negativa.

30 Basándose en las características antes mencionadas, la cepa ME 98-M3 fué identificada como perteneciente al género Streptomyces y denominada Streptomyces esp. ME 98-M3.

La producción de amastatinas por una cepa perteneciente

1 al género Streptomyces ha sido descubierta en esta invención.  
Por lo tanto, la invención incluye todas las cepas pertene-  
cientes al género Streptomyces que producen los tetrapépti-  
5 dos de acuerdo con esta invención y la cepa de Streptomyces  
esp. ME 98-M3 antes mencionada comprende todos los mutantes  
naturales y artificiales y todas las cepas que puedan perte-  
necer a la misma especie como la realización del microorga-  
nismo de acuerdo con esta invención.

10 Las amastatinas pueden obtenerse por cultivo del micro-  
organismo en un medio adecuado y en condiciones adecuadas.  
Los medios utilizados para el crecimiento de los microorga-  
nismos en esta invención son los medios nutrientes conoci-  
dos como adecuados para el crecimiento de las actinomicetos.  
15 Como fuente de carbono puede utilizarse cualquiera de los  
hidratos de carbono empleados normalmente en las fermenta-  
ciones, como glicerina, glucosa, almidón, dextrina, lactosa,  
sacarosa, maltosa, melazas y grasas. El nitrógeno también  
puede ser proporcionado por cualquiera de los materiales  
habitualmente empleados, como peptona, extracto de carne,  
20 licor de infusión de maíz, harina de semilla de algodón,  
harina de frutos de cáscara dura, harina de soja, extracto  
de levadura, casaminoácido, nitrato sódico, nitrato amónico  
y sulfato amónico. Los medios pueden contener cloruro sódico,  
25 fosfatos, carbonato cálcico y sulfato magnésico como  
nutrientes inorgánicos. También pueden agregarse otras sales  
metálicas como elementos traza, si es necesario. El cultivo  
o fermentación puede realizarse en cualquier tipo de cultivo  
aerobio como por ejemplo cultivo en un matraz sacudido o  
cultivo en un tanque fermentador. Se prefiere el cultivo su-  
30 mergido para la producción a gran escala. La temperatura de

1 fermentación debe seleccionarse dentro de la región en la  
que el microorganismo produce las amastatinas y, en especial,  
se prefiere un intervalo de 25 a 35°C. Generalmente la fer-  
mentación se prosigue hasta que se ha producido en el caldo  
5 de cultivo una cantidad sustancial de amastatinas.

La producción de amastatina puede ser analizada midiendo  
la actividad inhibidora sobre la aminopeptidasa A. El método  
de ensayo empleado es el siguiente: se mide la actividad de  
aminopeptidasa A de acuerdo con Nagatsu y colaboradores (I.  
10 Nagatsu, T. Nagatsu, T. Yamamoto y G.G. Glenner, Biochim.  
Biophys. Acta 198, 255-70, 1970) con una modificación. Se  
incuba a 37°C durante 3 minutos una mezcla de 1,0 ml de glu-  
tamil-β-naftilamida 0,00075M, 0,2 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,01M, 0,6 ml  
de solución de tampón tris.HCl 0,1M (tri(hidroximetil)amino-  
15 metano) (pH 7,0) y 0,1 ml de la solución de muestra. Se agre-  
ga a la mezcla 0,1 ml de solución de aminopeptidasa A (prepa-  
rada por fraccionamiento en sulfato amónico de acuerdo con el  
método de Nagatsu). La incubación a 37°C se prosigue durante  
30 minutos más y después se añaden 0,6 ml de solución tampón  
20 de acetato 1,0M, pH 4,2, conteniendo 0,1 % de sal GBC garnet  
f i j a (sal de o-aminoacetolúendiazonio) y se añade 10 % de  
Tween 20. Al cabo de 15 minutos a la temperatura ambiente,  
se mide la absorbancia (a) de la mezcla a 530 nm. Una mez-  
cla sin la muestra se trata también de la misma forma como  
25 control (b). Se calcula un grado de inhibición (%) de la ami-  
nopeptidasa A a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{b - a}{b} \times 100$$

30 Las concentraciones necesarias para un grado de inhibición  
del 50 % (DI<sub>50</sub>) en este ensayo fueron de 0,65 mcg/ml para

1 la amastatina A<sub>1</sub>, 0,54 mcg/ml para la A<sub>2</sub>, 1,0 mcg/ml para  
la A<sub>3</sub>, 1,5 mcg/ml para la B<sub>1</sub> y 1,0 mcg/ml para la B<sub>2</sub>, res-  
pectivamente.

5 Por ejemplo, se trata en autoclave un medio que contiene  
2 % de glicerina, 2 % de dextrosa, 1 % de Bactosoyton (Dif-  
co), 0,3 % de extracto de levadura, 0,2 % de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y  
0,2 % de CaCO<sub>3</sub>, pH 7,4 y se inocula con esporas y/o micelio  
10 obtenidos de un cultivo en tubo inclinado de Streptomyces  
esp. ME 98-M3. Todas las expresiones (%) se refieren a por-  
centaje en peso/volumen en esta memoria, salvo indicación  
en contrario. La acumulación de amastatinas fué detectada  
al cabo de 3-7 días de cultivo aerobio sacudido a 27°C.

15 La Tabla II muestra la producción de amastatinas en  
cultivos sacudidos con diversos medios. La fermentación se  
realizó empleando 100 ml del medio en un matraz de 500 ml  
en un sacudidor rotatorio (180 rpm) a 29°C y para el análisis  
se tomó una muestra de 0,5 ml de caldo.

TABLA II

Producción de amastatina en diversos medios de cultivo

20

Nº	Composición del medio	pH ini- cial	Producción de amastatina					pH fi- nal
			Inhibición (%)					
			día					
1	2	3	4	7				
1.	Almidón	1,0	6,7				31,5	8,6
	Glucosa	1,0						
	Harina de soja	2,0						
	Extracto de le- vadura	0,5						
2.	Aceite de soja	2,0	7,1				26,9	9,0
	Almidón	0,5						
	Glucosa	0,5						

30

TABLA II (continuación)

Producción de amastatina

5	Nº	Composición del medio	pH inicial	Inhibición (%)					PH final	
				Día						
				1	2	3	4	7		
	2.	Harina de soja	2,5							
	3.	Glicerina	2,5	7,0				23,2	9,1	
		Extracto de carne	0,5							
		Polipeptona	0,5							
10	4.	Maltosa	2,0	7,8				17,6	9,3	
		Extracto de carne	0,5							
		Polipeptona	0,5							
		Extracto de levadura	0,3							
15	5.	Almidón	2,0	7,1	26,2	31,6	35,3	33,5	46,2	8,1
		Glucosa	1,0							
		Extracto de levadura	0,5							
		Casaminoácido	0,5							
20	6.	Lactosa	2,5	7,8				26,0	9,4	
		Extracto de levadura	0,5							
		Extracto de carne	0,5							
		Polipeptona	0,75							
25	7.	Sacarosa	4,0	7,9				22,2	9,5	
		Hidrolizado de proteína	2,5							
	8.	Glicerina	2,0	6,9	40,0	52,7	52,7	50,2	49,1	8,2
		Dextrina	2,0							
		Peptona de soja*	1,0							
30		Extracto de levadura	0,3							



TABLA III

Producción de amastatina en diversos medios

N°	Composición del medio (%)		..... Fuente de nitrógeno	..... pH	Producción de amastatina al cabo de 4 días de incubación
	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno			
A	Almidón 3,0	Harina de soja	2,0	6,7	18,0
B	3,0	Levadura seca	2,0	6,1	23,0
C	6,0		4,0	6,8	41,3
D	3,0	Harina de semilla de algodón	2,0	6,5	25,9
E	6,0		4,0	6,5	58,6
F	Glicerina 3,0	Harina de soja	2,0	8,4	15,2
G	3,0	Levadura seca	2,0	8,2	16,0
H	3,0	Harina de semilla de algodón	2,0	8,3	17,1
I	Harina de soja 3,0	Harina de soja	2,0	7,4	43,1
J	6,0		4,0	6,8	55,1
K	3,0	Levadura seca	2,0	7,4	36,6
L	6,0		4,0	6,9	46,1
M	3,0	Harina de semilla de algodón	2,0	6,4	30,4
N	Almidón 4,5 Harina de soja 1,5	Levadura seca	4,0	6,4	57,1
O		Harina de semilla de algodón	4,0	6,5	61,8
P	Almidón 6,0	Harina de semilla de algodón	4,0	6,0	64,3
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2		

Harina de soja: "Es-san meat", Ajinomoto Co.

Harina de semilla de algodón: "Pharmamedia", Traders Oil Mill Co.

TABLA III

Producción de amastatina en diversos me

N°	Composición del medio (%)		Fuente de nitrógeno	
	Fuente de carbono			
A	Almidón	3,0	Harina de soja	2,0
B		3,0	Levadura seca	2,0
C		6,0		4,0
D		3,0	Harina de semilla de algodón	2,0
E		6,0		4,0
F	Glicerina	3,0	Harina de soja	2,0
G		3,0	Levadura seca	2,0
H		3,0	Harina de semilla de algodón	2,0
I	Harina de soja	3,0	Harina de soja	2,0
J		6,0		4,0
K		3,0	Levadura seca	2,0
L		6,0		4,0
M		3,0	Harina de semilla de algodón	2,0
N	Almidón	4,5	Levadura seca	4,0
	Harina de soja	1,5		
O			Harina de semilla de algodón	4,0
P	Almidón	6,0	Harina de semilla de algodón	4,0
			(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2

Harina de soja: "Es-san meat", Ajinomoto Co.

Harina de semilla de algodón: "Pharmamedia", Traders Oil Mill Co.

TABLA III

Producción de amastatina en diversos medios

Medio (%)	Fuente de nitrógeno	Producción de amastatina al cabo de 4 días de incubación		
		pH	Inhibición (%)	
	Harina de soja	2,0	6,7	18,0
	Levadura seca	2,0	6,1	23,0
		4,0	6,8	41,3
	Harina de semilla de algodón	2,0	6,5	25,9
		4,0	6,5	58,6
	Harina de soja	2,0	8,4	15,2
	Levadura seca	2,0	8,2	16,0
	Harina de semilla de algodón	2,0	8,3	17,1
	Harina de soja	2,0	7,4	43,1
		4,0	6,8	55,1
	Levadura seca	2,0	7,4	36,6
		4,0	6,9	46,1
	Harina de semilla de algodón	2,0	6,4	30,4
	Levadura seca	4,0	6,4	57,1
	Harina de semilla de algodón	4,0	6,5	61,8
	Harina de semilla de algodón	4,0	6,0	64,3
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2		

Inomoto Co.

Armamedia", Traders Oil Mill Co.

1           Estos resultados demuestran que la producción de amastatina varía con el medio y con el tiempo de incubación. Los  
ingredientes preferibles del medio para la producción de  
5           amastatina son glicerina, glucosa, almidón, harina de soja, peptona de soja, harina de semilla de algodón, licor de infusión de maíz, aceite de soja, levadura, casaminoácido y sulfato amónico.

10           Los fermentadores sacudidos y tanques también permiten obtener una buena producción de amastatina. Por ejemplo, se realizó un cultivo sumergido a escala de tanque con 100 litros del Medio P de la Tabla III en un fermentador de 200 litros. Al cabo de 96 horas de incubación con 100 litros/minuto de aireación y agitando a 200 rpm, se obtuvo la máxima producción de amastatina y 0,1 ml del caldo en ese momento  
15           dió una inhibición del 50 % en el método de ensayo antes mencionado. Habitualmente son coproducidos en el caldo de fermentación todos los análogos de amastatina, es decir, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>. La proporción de cada uno de los análogos en el caldo depende de la cepa de microorganismo, del medio, de las  
20           condiciones de cultivo y similares.

25           Las amastatinas así producidas en el caldo de fermentación pueden ser recuperadas por cualquier método que pueda emplearse para el aislamiento y la purificación de péptidos y convencional por sí mismo. Para el aislamiento a pequeña escala, el filtrado del caldo se evapora a vacío a sequedad y el residuo se extrae con un disolvente que pueda disolver  
30           a los péptidos, como metanol, etanol, dimetilsulfóxido, ácido acético o piridina. En el trabajo a gran escala, las amastatinas se extraen del filtrado del caldo con un disolvente que pueda disolver a los péptidos y no sea miscible con agua,

1 como n-butanol. Por concentración de los extractos se obtie-  
nen las amastatinas en forma de polvo crudo.

5 Las amastatinas son aisladas satisfactoriamente por  
adsorción en un adsorbente convencional, v.g. carbón activo,  
un adsorbente orgánico como Amberlite XAD-4 (Rohm and Haas  
Co.) y celulosa, cambiadoras de ion y gel de sílice. Por  
ejemplo, se agrega carbón activo al filtrado del caldo (2 %) para adsorber los péptidos. El carbón activo se separa por  
10 filtración y se lava con agua y después con 20-25 volúmenes  
de metanol a 40°C dos veces. Mediante la elución con metanol  
se obtiene más del 70 % de la amastatina del caldo. De esta  
forma se aíslan los análogos de amastatina coproducidos en  
forma de polvo crudo de su mezcla. Cada análogo de amastati-  
na puede ser fraccionado eficazmente y purificado por cromatografía. Para ello se emplea celulosa con una mezcla de  
15 acetato de etilo/etanol/amoniaco (17:2:1) como sistema disol-  
vente preferido. También es posible aislar y purificar me-  
diante una resina cambiadora de ion, basándose en los gru-  
pos funcionales ácidos y básicos de las amastatinas. Se pre-  
fieren las resinas cambiadoras de ion fuertemente básicas o  
20 fuertemente ácidas.

25 Esta invención también incluye un procedimiento para  
la preparación de derivados de amastatina. Las sales metáli-  
cas de las amastatinas se obtienen fácilmente por neutrali-  
zación. Otra forma salina de la amastatina se prepara por  
cristalización después de agregar un ácido inorgánico como  
ácido clorhídrico, ya que las amastatinas contienen un grupo  
amino libre. Los derivados N-acilados se obtienen por trata-  
30 miento con un anhídrido o un haluro de un ácido orgánico,  
como ácido acético y ácido propiónico en condiciones adecua-

1        das. Las amastatinas A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y B<sub>2</sub> (22 mg, 20 mg y 20 mg, res-  
pectivamente) se disuelven en agua. Se agrega cloruro de  
acetilo a la solución a pH 8,5 para acetilar el grupo ami-  
no libre. Se obtienen las N-acetilamastatinas A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y B<sub>2</sub>  
5        con un rendimiento de 13 mg, 11 mg y 10 mg, respectivamen-  
te. Los espectros de RMN e IR confirman que los productos  
son amastatinas N-acetiladas. Los ésteres de las amastati-  
nas se preparan por esterificación del grupo carboxilo li-  
bre con un alcohol en condiciones adecuadas. A las N-acetil-  
10       amastatinas A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y B<sub>2</sub> (9 mg, 8 mg y 8 mg, respectivamen-  
te) se agrega una mezcla de 0,5 ml de cloruro de tionilo y  
4 ml de metanol en un baño de hielo. La mezcla de reacción  
se mantiene en el hielo durante 30 minutos y después a la  
temperatura ambiente durante la noche. Por evaporación a  
15       vacío a sequedad se obtiene el éster dimetílico de la N-ace-  
tilamastatina (10 mg del éster dimetílico de A<sub>2</sub>, 9 mg del  
de A<sub>3</sub> y 9 mg del B<sub>2</sub>, respectivamente). Los espectros de RMN  
y de masas confirman que los productos son los ésteres di-  
20       metílicos de las N-acetil-amastatinas A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y B<sub>2</sub> respec-  
tivamente. Por lo tanto, esta invención comprende los pro-  
cedimientos para las preparaciones de sales, derivados N-  
acetilados y ésteres de las amastatinas.

25       Las amastatinas de esta invención presentan una inten-  
sa actividad inhibidora de la aminopeptidasa A, como ya se  
ha mencionado. La actividad inhibidora es tan específica de  
la aminopeptidasa A que las otras aminopeptidasas, como la  
B, no son susceptibles a estos tetrapéptidos. La Tabla IV  
indica los valores de la DI<sub>50</sub> de las amastatinas con las  
aminopeptidasas A y B.

1

TABLA IV

Inhibición de la aminopeptidasa A y B por las amastatinas

5

Amastatinas	DI <sub>50</sub> (mcg/ml)	
	Aminopeptidasa A	Aminopeptidasa B
A <sub>1</sub>	0,65	>100
A <sub>2</sub>	0,54	>100
A <sub>3</sub>	1,0	>100
B <sub>1</sub>	1,5	>100
B <sub>2</sub>	1,0	>100

10

La aminopeptidasa A es inhibida a una concentración de 0,5-1,5 mcg/ml pero la aminopeptidasa B no es afectada incluso en presencia de 100 mcg/ml de amastatina.

15

Además de su actividad inhibidora, los nuevos tetra-péptidos de esta invención estimulan la formación de anticuerpos humorales.

20

Cuando unos ratones (dd/Y) se inmunizan por inyección intravenosa de  $10^8$  glóbulos rojos de cordero (GRC), se administran las amastatinas en solución salina por vía intraperitoneal y oral a los ratones. Cuatro días después, se determina el número de células formadoras de placas (CFP) en el bazo mediante la técnica hemolítica de placas de Jerne (N.K. Jerne, A.A. Nordin y C. Henry: The agar plaque technique for recognizing antibody-producing cells, Cellbond Antibodies. B. Amos y H. Koprowskied, págs. 109-122, Wister Institute Press, Philadelphia, 1963; N.K. Jerne y A.A. Nordin, Plaque Formation in Agar by Single Antibody Producing Cells, Science, 140, págs. 405, 1963).

25

30

Como indica la Tabla V, la inyección intraperitoneal de 1 a 1000 mcg/ratón o la administración oral de 10 a 1000 mcg/ratón de amastatina A<sub>2</sub> conduce a un aumento del número

de células formadoras de placa (CFP) de alrededor de 2 a 3 veces el número de CFP en el antígeno solamente.

TABLA V

Efecto de la amastatina sobre la formación de anticuerpos a los GRC (I) en ratones

$10^8$ GRC	Amastatina A <sub>2</sub> , dosis/ratón* <sup>2</sup>	Amastatina administrada por	
		i.p.	oral
		CFP/bazo	
	0	149.000	125.000
"	1000 µg	235.000	153.000
"	100	283.000	192.800
"	10	504.000	286.400
"	1	264.800	102.700

\* Inyectado por vía intraperitoneal en el momento de la inmunización.

Después de haber inyectado amastatina A<sub>2</sub> por vía intraperitoneal una vez al día durante 4, a unos ratones, estos se inmunizaron por inyección intravenosa de  $10^8$  GRC. Cuatro días después de la inmunización, se determinó el número de células formadoras de anticuerpo en el bazo de los ratones.

Como resultado de la inyección intraperitoneal de 100 a 1000 mcg/ratón/día de amastatina A<sub>2</sub> aumentó el número de CFP alrededor de dos o tres veces frente al número de CFP en el antígeno solo.

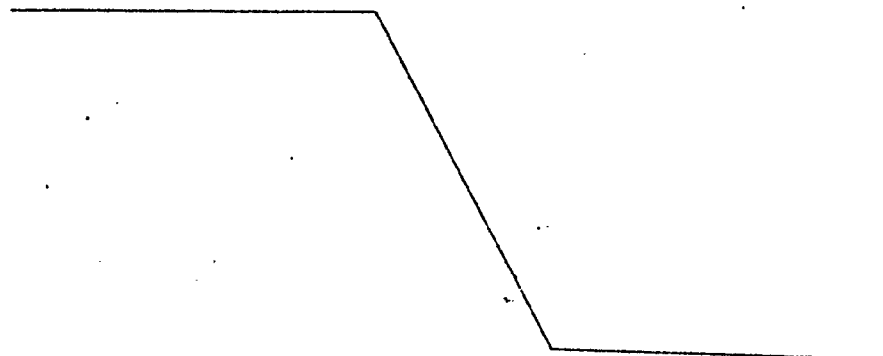


TABLA VI

Efecto de la amastatina sobre la formación de anticuerpos a

GRC (II) en ratones

Dosis en µg/ratón*	GRC**	CFP/bazo
0	10 <sup>8</sup> GRC	76.000
1000	"	121.000
100	"	138.000
10	"	196.000
1	"	58.000

\* Días -4 - -1, i.p.

\*\* Día 0, i.v.

El efecto de amastatina sobre la formación de anticuerpos primarios contra los GRC en los cultivos de células de bazo disociadas fué examinado por los métodos descritos por Mishell y Dutton. Se prepararon cultivos totalmente de bazo ( $1,5 \times 10^7$ ) a partir de bazos de ratones CDF<sub>1</sub> y se cultivaron con 10<sup>6</sup> GRC como antígeno durante 4 días a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 7 %. La amastatina se disolvió en el medio y se agregó una concentración de amastatina de 0,0001 µg a 1 µg por cultivo en el momento de la inmunización (0 horas), y 24, 48 o 72 horas después de iniciar los cultivos. Cuatro días después de iniciar los cultivos, se determinó la formación de anticuerpos de cada cultivo por enumeración de las CFP utilizando el método descrito por Cuningham y colaboradores.

Como muestra la Tabla VII, la adición de 0,01 a 1 µg de amastatina A<sub>2</sub> al cultivo de células de bazo, 0 o 24 horas después de iniciarse los cultivos, aumenta el número de CFP.

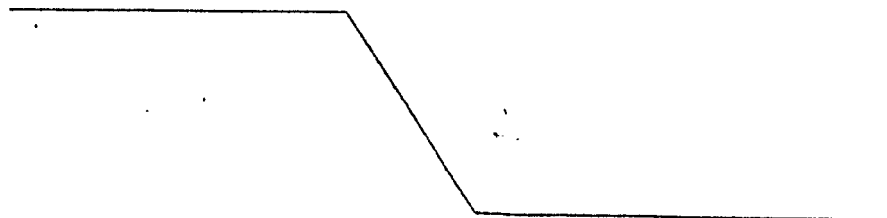
---

TABLA VII

	Amastatina, µg/cultivo	Adición de amastatina, horas después de iniciar el cultivo			
		0	24	48	72
10 <sup>6</sup> GRC	0	2920	-	-	-
"	1	4420	3100	2280	2520
"	0,01	4200	2960	2380	3160
"	0,0001	2900	3080	2940	3080

También la amastatina aumenta el establecimiento de la hipersensibilidad de tipo retardado (HTR) a los GRC. Unos ratones hembra dd/Y fueron inmunizados por inyección de 10<sup>8</sup> GRC en 0,05 ml de solución salina, en la planta del pie de la pata trasera derecha. Cuatro días después, se desencadenó la reacción por inyección de 10<sup>8</sup> GRC en la planta del pie trasero izquierdo y 24 horas más tarde se midió el aumento del espesor de la planta del pie trasero izquierdo.

Se inyectó amastatina A<sub>2</sub> por vía intraperitoneal una vez al día a los ratones, durante 4 días, antes de la inmunización por 10<sup>8</sup> GRC. Como muestra la Tabla VIII, una dosis de 0,1 a 10 mcg/ratón/día de amastatina A<sub>2</sub> aumenta la respuesta de la planta del pie pero la inyección de 100 mcg/ratón/día no produce ningún efecto sobre la respuesta de la planta del pie. Tampoco la inyección intraperitoneal de 1 a 1000 mcg/ratón de amastatina A<sub>2</sub> en el momento de la inmunización aumenta la respuesta de la planta del pie.



1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

TABLA VIII

Influencia de la amastatina sobre el establecimiento de la hipersensibilidad de tipo retardado a los GRC en ratones

Dosis en $\mu\text{g}/\text{ratón}$	Amastatina inyectada al cabo de días	
	-4	-1
0	10,2	9,0
1000	-	8,1
100	10,0	7,3
10	14,3	8,1
1	14,1	8,4
0,1	13,8	-

\* En el momento de la inmunización.

El hecho de que las amastatinas aumenten la formación de anticuerpos y favorezcan el establecimiento de HTR indica la posible aplicación de los péptidos para potenciar el sistema de defensa del huésped contra las infecciones bacterianas y víricas y también contra el cáncer. La aminopeptidasa A es una de las angiotensinasas. La intensa inhibición de la actividad enzimática produce una inhibición de la descomposición de la angiotensina II para mantener una cierta concentración de angiotensina y elevar la presión sanguínea. Posiblemente las amastatinas podrán utilizarse para este fin y también para potenciar la actividad de aldosterona.

Las amastatinas de esta invención presentan una toxicidad muy baja. Los inhibidores convencionales de aminopeptidasa A son sustancias muy tóxicas, por ejemplo agentes quelatantes de metales como ácido etilendiaminotetraacético u

1 o-fenantrolina o agentes modificadores de las protefnas. Las  
amastatâinas producen la inhibici3n a una concentraci3n mäs  
baja y su toxicidad es mucho menor que la de los inhibidores  
5 convencionales. La Tabla IX contiene los valores de la toxi-  
cidad aguda de la amastatina en ratones por administraci3n  
intraperitoneal.

TABLA IX

Toxicidad de las amastatinas

Amastatinas	Dosis (mg/kg ip)	Toxicidad
A <sub>1</sub>	125	nula
A <sub>2</sub>	125	nula
A <sub>3</sub>	125	nula
B <sub>1</sub>	125	nula
15 B <sub>2</sub>	125	nula

Los siguientes ejemplos ilustran esta invenci3n pero se sobreentiende que se dan solamente con fines ilustrativos y no limitativos.

EJEMPLO 1

20 Se esterilizan 100 l de un medio que contiene 6,0 % de almid3n soluble, 4,0 % de harina de semilla de algod3n, 0,2 % de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 % de extracto de levadura, 0,2 % de CaCO<sub>3</sub>, 0,05 % de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 % de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 % de NaCl y 0,01 % de Adecanol (antiespumante, Asahidenka Co.) en un  
25 fermentador de acero inoxidable de 200 litros, a 120°C durante 30 minutos y se inocular con 5 litros de un cultivo de siembra de Streptomyces esp. ME 98-M3 (FERM p-3722) preparado con el mismo medio por cultivo en matraz. El cultivo sumergido se realiza a 27°C durante 96 horas con una aireaci3n  
30 de 200 litros/minuto y agitando a 200 rpm. Se obtienen 200 litros de caldo filtrado de 2 lotes de fermentaci3n.

1 El filtrado, cuya  $DI_{50}$  es 0,1 ml, se aplica a una columna de 3 litros de Amberlite XAD (-4) (Rohm and Haas Co.). Las amastatinas se eluyen con 30 litros de metanol al 50 %. Concentrando a vacío el eluato a 60°C se obtiene un polvo  
5 crudo de amastatinas (390 g). La  $DI_{50}$  del polvo es de 250 mcg/ml.

Se disuelven 390 g del polvo en 3,9 litros de agua, ajustando el pH a 8,2 con NaOH 1N y la solución se aplica a una columna de Dowex 1 (X4)(tipo acetato, 3,5 litros, Dow  
10 Chemicals Co.). Por elución con 10 litros de ácido acético 0,1N, después de lavar con 10 litros de agua, se obtienen 110 g de polvo activo ( $DI_{50} = 100$  mcg/ml). Este polvo se disuelve en 1,1 litros de una solución tampón de piridina 0,3M/ácido acético (pH 6,0) y se aplica a una columna de  
15 DEAE-Sephadex A25 (600 ml, Pharmacia Fine Chemicals AB), previamente equilibrada con el mismo tampón. Un pico activo obtenido por elución con el mismo tampón se concentra a vacío para dar 30,6 g de polvo activo ( $DI_{50} = 40$  mcg/ml).

Una solución del polvo activo en 400 ml de solución  
20 tampón de piridina 0,05M/ácido fórmico (pH 2,9) se aplica a una columna de Dowex 50 (X4)(310 ml, Dow Chemicals Co.) previamente equilibrada con el mismo tampón. Se obtiene un pico activo por elución con un gradiente lineal de tampón de piridina/ácido fórmico desde 0,05M, pH 2,9, hasta 0,2M,  
25 pH 3,1 (2 litros). Por concentración a vacío del pico se obtienen 5,1 g del polvo activo ( $DI_{50} = 8,5$  mcg/ml).

El polvo se purifica todavía más por cromatografía en gel de sílice con un sistema disolvente de acetato de n-butilo/n-butanol/ácido acético/agua (12:4:1:1). Se obtienen  
30 0,8 g de un polvo muy activo ( $DI_{50} = 2,5$  mcg/ml). Para frac-

1 cionar el polvo activo en cada uno de los análogos de amastatina, se realiza de nuevo la cromatografía en la columna  
5 Dowex 50 (X4) antes mencionada. Mediante esta recromatografía se separan entre sí las amastatinas A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y B<sub>2</sub>. Cada polvo obtenido por concentración de la fracción activa se desalifica por adsorción en Dowex 50 (X4) (tipo H<sup>+</sup>) y por elución con NH<sub>4</sub>OH 0,2N. Se obtienen las siguientes amastatinas prácticamente puras:

10 A<sub>2</sub>: 30 mg (DI<sub>50</sub> 0,54 mcg/ml),

A<sub>3</sub>: 47 mg (DI<sub>50</sub> 1,0 mcg/ml) y

B<sub>2</sub>: 20 mg (DI<sub>50</sub> 1,0 mcg/ml).

Estas preparaciones tienen las propiedades fisicoquímicas antes descritas.

#### EJEMPLO 2

15 Se esterilizan 125 ml de un medio que contiene 2% de almidón de patata, 2 % de harina de semilla de algodón, 1 % de licor de infusión de maíz y 0,32 % de CaCO<sub>3</sub> en un matraz de 500 ml a 120°C durante 20 minutos, se inocula con Streptomyces esp. ME 98-M3 (FERM p-3722) y se incuba a 27°C  
20 con sacudidas de vaivén a 130 rpm durante 2 días. Este cultivo se utiliza como siembra.

25 En un fermentador vibratorio de 30 litros se esterilizan 15 litros de un medio que contiene 2 % de glicerina, 2 % de dextrina, 1 % de Bactosoytone (Difco Co.), 0,3 % de extracto de levadura, 0,2 % de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0,2 % de CaCO<sub>3</sub>, se inocula con 1 litro del cultivo de siembra preparado como se ha descrito antes y se incuba aireando a 15 litros/minuto y agitando a 200 rpm a 27°C durante 4 días. Se obtienen  
30 50 litros de un filtrado del caldo cuya DI<sub>50</sub> es 0,14 ml, a partir de 4 lotes del cultivo en el fermentador vibratorio.

1 El filtrado se somete a purificación prácticamente por  
el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Por recro-  
matografía del polvo activo obtenido por tratamiento con  
5 gel de sílice y desalificación con Dowex 50 se obtienen  
25 mg de amastatina A<sub>1</sub> esencialmente pura (DI<sub>50</sub> = 0,65 mcg/  
ml) y 35 mg de amastatina B<sub>1</sub> esencialmente pura (DI<sub>50</sub> =  
1,50 mcg/ml). Las propiedades fisicoquímicas de las prepara-  
ciones concuerdan con los resultados citados.

EJEMPLO 3

10 Se disuelven 3 mg de amastatina A<sub>1</sub> en 0,5 ml de HCl  
0,1N y se mantiene a la temperatura ambiente durante una  
hora. Por concentración a vacío de la solución y evaporación  
del exceso de ácido clorhídrico se obtiene la sal de ácido  
15 clorhídrico de amastatina A<sub>1</sub>. Por el mismo método se obtie-  
nen las sales de los otros análogos. Estas sales tienen las  
siguientes propiedades:

A<sub>1</sub>.HCl: p.f. 165-170°C

Espectro IR: 3400, 3270, 2950, 1710, 1660, 1640, 1540,  
20 1470, 1390, 1285, 1230, 1180, 1090 cm<sup>-1</sup>.

DI<sub>50</sub> = 0,75 mcg/ml.

A<sub>2</sub>: p.f. 158-162°C

Espectro IR: 3300, 2950, 2600, 1725, 1660, 1640, 1535,  
25 1470, 1395, 1280, 1230, 1180, 1090, 930 cm<sup>-1</sup>.

DI<sub>50</sub> = 0,6 mcg/ml.

A<sub>3</sub>: p.f. 148-153°C

Espectro IR: 3250, 2930, 2600, 1710, 1650, 1635, 1530,  
30 1465, 1390, 1220, 1113, 930 cm<sup>-1</sup>.

DI<sub>50</sub> = 1,1 mcg/ml.

B<sub>1</sub>: p.f. 160-165°C

Espectro IR: 3400, 3270, 2950, 1710, 1655, 1635, 1540,

1 1470, 1390, 1290, 1230, 1170, 1070  $\text{cm}^{-1}$ .

$\text{DI}_{50} = 1,2 \text{ mcg/ml}$ .

$\text{B}_2 \cdot \text{HCl}$ : p.f. 145-150°C

5 Espectro IR: 3400, 3250, 2900, 1720, 1690, 1625, 1535,  
1435, 1385, 1275, 1220, 1175, 1155, 1105, 1085, 1010, 985,  
925, 790  $\text{cm}^{-1}$ .

$\text{DI}_{50} = 1,1 \text{ mcg/ml}$ .

#### EJEMPLO 4

10 Se disuelven 22 mg de amastatina  $\text{A}_2$  en 10 ml de agua.  
Se añaden 0,5 ml de cloruro de acetilo a lo largo de cuatro  
veces, a intervalos de 10 minutos, agitando a la temperatura  
ambiente y manteniendo el pH a 8,5 con NaOH 1N. Al cabo de  
2 horas, el pH se ajusta a 2,0 con HCl concentrado y la mez-  
cla se extrae con 20 ml de acetato de etilo dos veces. Por  
15 concentración a vacío de la capa disolvente se obtienen 13 mg  
del producto, p.f. 160-164°C.  $\text{DI}_{50} = 450 \text{ mcg/ml}$ .

El espectro IR y de RMN confirman que el producto es  
la N-acetil-amastatina  $\text{A}_2$ .

20 Por el mismo método se obtienen las N-acetil-amastati-  
nas  $\text{A}_1$ ,  $\text{A}_3$ ,  $\text{B}_1$  y  $\text{B}_2$ .

#### EJEMPLO 5

25 Se disuelven 30 mg de amastatina  $\text{A}_2$  en 2 ml de metanol  
absoluto. Mientras se enfría con hielo se añade una mezcla  
de 1 ml de cloruro de tionilo y 2 ml de metanol absoluto  
y después la mezcla se agita con enfriamiento durante 30 mi-  
nutos y después a la temperatura ambiente durante la noche.  
Por concentración a vacío de la mezcla se obtienen 31 mg del  
producto de reacción, p.f. 148-153°C.  $\text{DI}_{50} = 17 \text{ mcg/ml}$ .

30 El espectro IR y de RMN confirma que el producto es el  
éster dimetílico de la amastatina  $\text{A}_2$ .

1 Por el mismo método se obtienen los ésteres dimetílicos de las amastatinas A<sub>3</sub> y B<sub>2</sub>. De la misma manera las N-acetil-amastatinas A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y B<sub>2</sub> forman los ésteres dimetílicos de cada uno de los análogos, respectivamente.

5 También se obtienen por el mismo procedimiento los ésteres monometílicos de las amastatinas A<sub>1</sub> y B<sub>1</sub>.

10 La resina sólida Amberlite XAD es un polímero de poliestireno entrecruzado, macrorreticular (patente estadounidense 3.531.463). Estas resinas adsorbentes macroporosas no iónicas tienen una estructura básica aromática con un diámetro medio de poro de 4-20 nm, preferiblemente de 7-10 nm, especialmente las resinas de poliestireno con una superficie específica de 100 a 1000 m<sup>2</sup>/g que son copolímeros de estirenodivinilbenceno comercializados por Rohm & Haas Co. con el nombre de resinas Amberlite XAD.

15 La resina Dowex 50 es un ácido poliestirensulfónico en el núcleo.

20 La resina "Sephadex LH-20" es un medio cromatográfico liofílico insoluble, constituido por tamices moleculares, preparado por entrecruzamiento de dextrano y vendido por Pharmacia, Uppsala, Suecia.

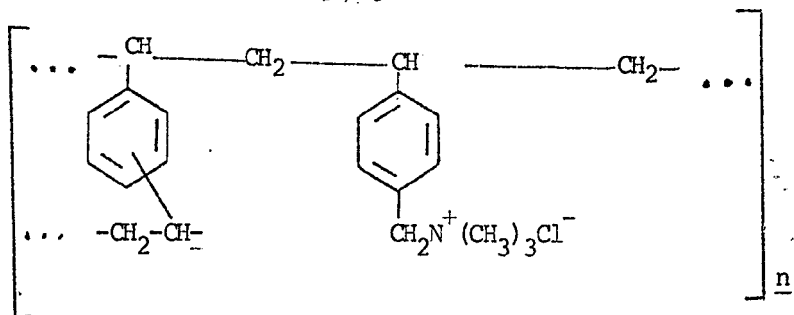
25 Sephadex LH-20 puede ser sustituido por otros agentes de filtración de gel similares, v.g. Sephadex G25 y G200, Sepharosa 4B y 6B (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suecia) y Bio-Gel A1,5 m (Bio Rad Co.). Los agentes de filtración de gel preferidos son los geles de dextrano entrecruzados sustituido con carboximetilo, descritos en las columnas 3 y 4 de la patente estadounidense 3.819.836.

30 La resina Dowex 1 (X2) (OH<sup>-</sup>) es la forma básica o de hidróxido de la resina de colestiramina que en su forma de

1

cloruro es una resina cambiadora de anión sintética, fuertemente básica, que contiene grupos funcionales amonio cuaternario que están unidos a un copolímero de estireno-divinilbenceno. El principal constituyente: poliestireno-trimetilbencilamonio como anión  $\text{Cl}^-$ , también contiene divinilbenceno (alrededor de 2 %) y agua:

5



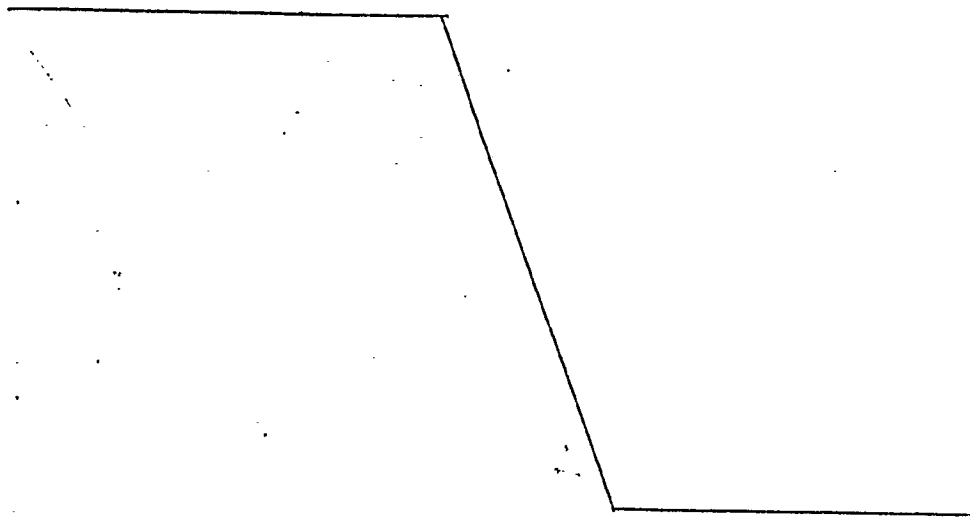
15

Estructura típica de los grupos poliméricos principales (alrededor de 43 %). Porcentaje de entrecruzamiento: 1-10. Tamaño de partícula: 50-100 mallas. Porcentaje de aumento de volumen, desde nuevo hasta agotado ( $\text{Cl}^-$  a  $\text{OH}^-$ ) = 20 %. Estable a temperaturas hasta de  $150^\circ$ . Capacidad: 3,5 meq/g en seco, 1,33 meq/ml en mojado.

20

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

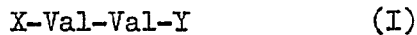
25



30

REIVINDICACIONES

1 1.- Un procedimiento para la producción de un tetra-  
péptido de fórmula I:



5 donde

X representa un resto  $\beta$ -amino-2-hidroxi-5-metilhexanoil  
lo o un resto  $\beta$ -amino-2-hidroxi-4-metilhexanoilo;

Val representa un resto L-valilo e

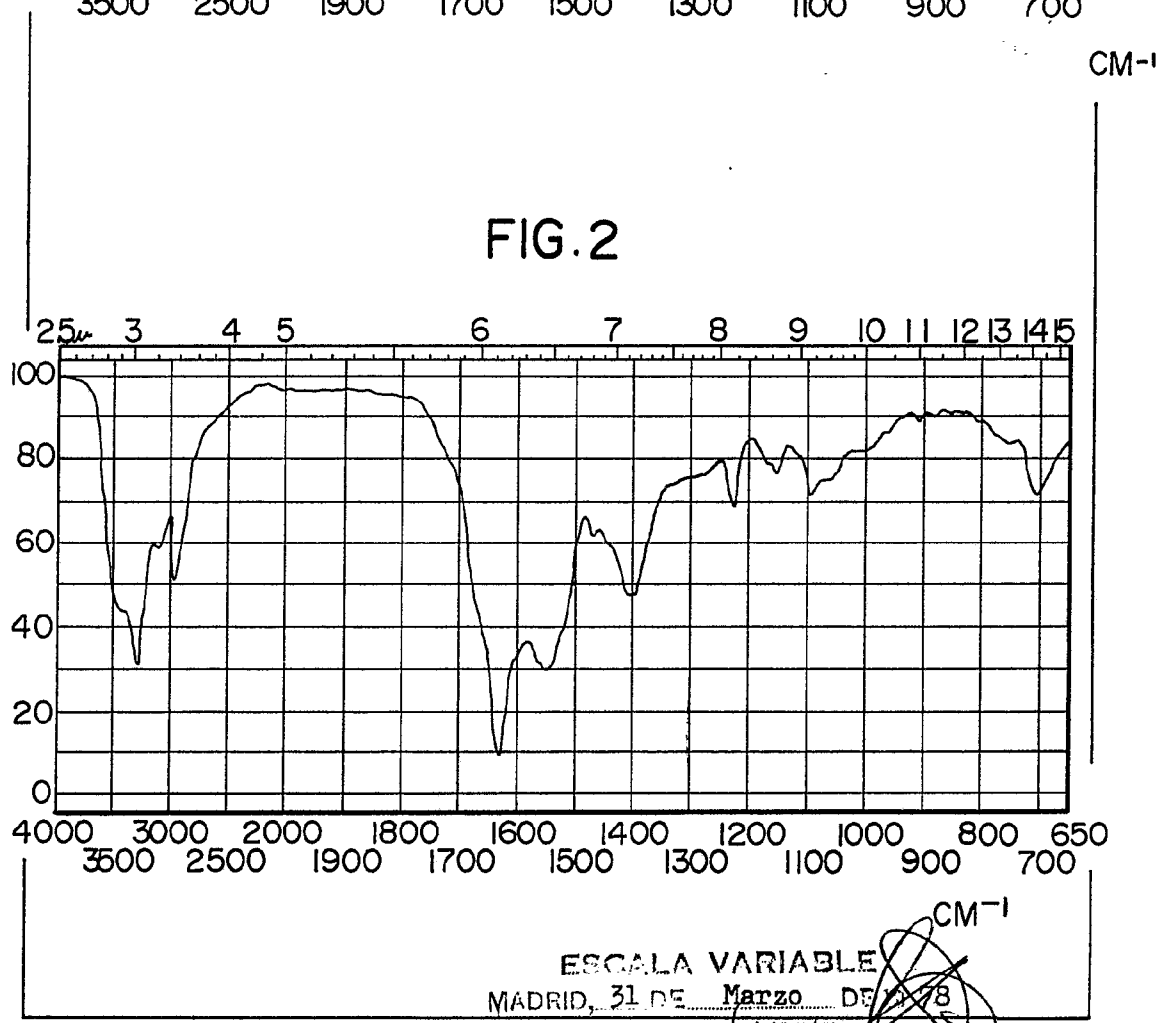
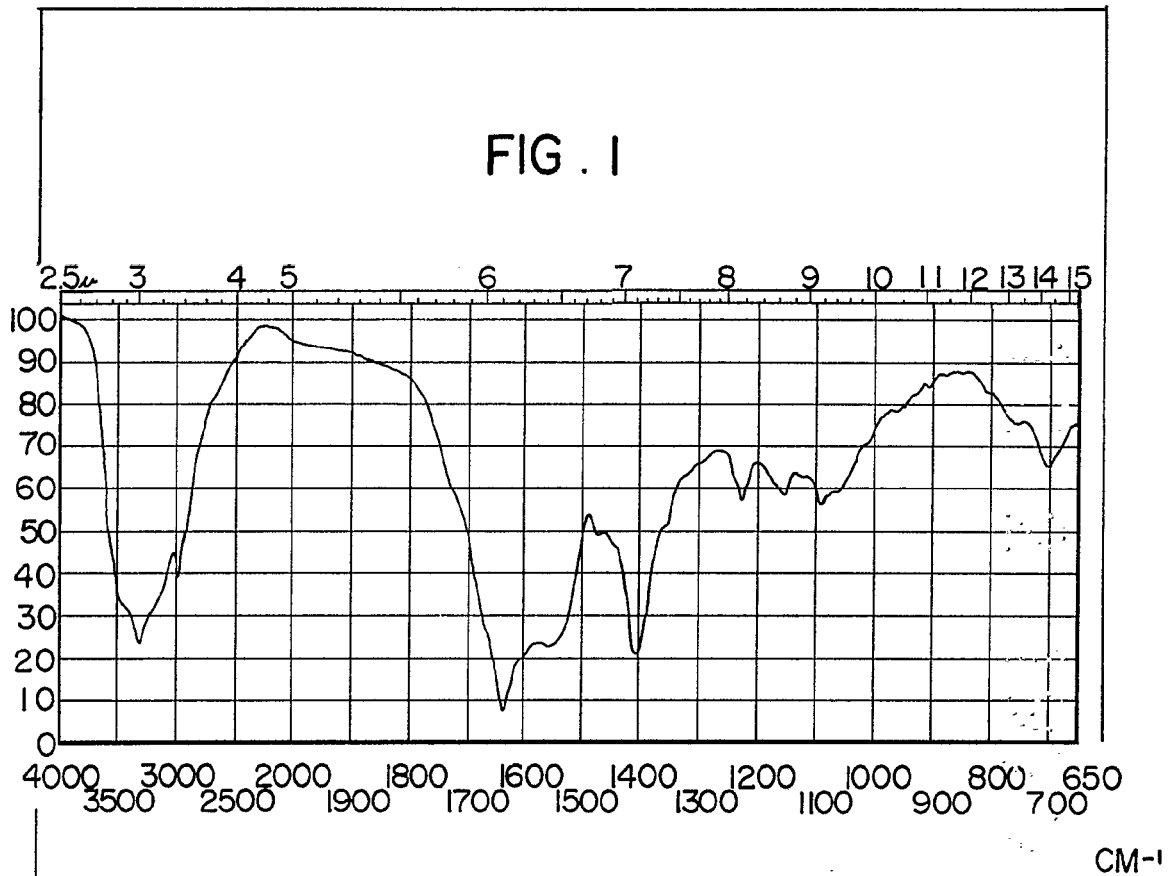
10 Y representa  $\alpha$ -amida de ácido L-aspartico, ácido L-as  
pártico o ácido L-glutámico cuando X es un resto  $\beta$ -  
amino-2-hidroxi-5-metilhexanoilo y  $\alpha$ -amida de ácido  
L-glutámico o ácido L-glutámico cuando X es un resto  
15  $\beta$ -amino-2-hidroxi-4-metilhexanoilo y el grupo amino  
del radical Val Adyacente a X está acilado con el  
grupo carboxilo de X para formar una unión amida, el  
grupo carboxilo de dicho radical Val acila al grupo  
amino del otro radical Val para formar una unión ami  
da y el grupo carboxilo del otro radical Val acila  
al grupo amino de Y para formar una unión amida;

20 cuyo procedimiento consiste en cultivar aeróbicamente un mi  
croorganismo que es capaz de producir dichos tetrapéptidos  
y pertenece al género Streptomyces, en un medio adecuado pa  
ra el crecimiento de dicho microorganismo, para acumular di  
cho tetrapéptido y recuperar el tetrapéptido así producido.

25 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde  
el microorganismo presenta las características identificado  
ras del A.T.C.C. 31318.

30 3.- Se reivindica por último como objeto sobre el que  
ha de recaer la Patente de Invención que se solicita por: UN  
PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN TETRAPEPTIDO.





ESCALA VARIABLE  
MADRID, 31 DE Marzo DE 1978  
BERNARDO UNGRIA  
P. P.

FIG. 3

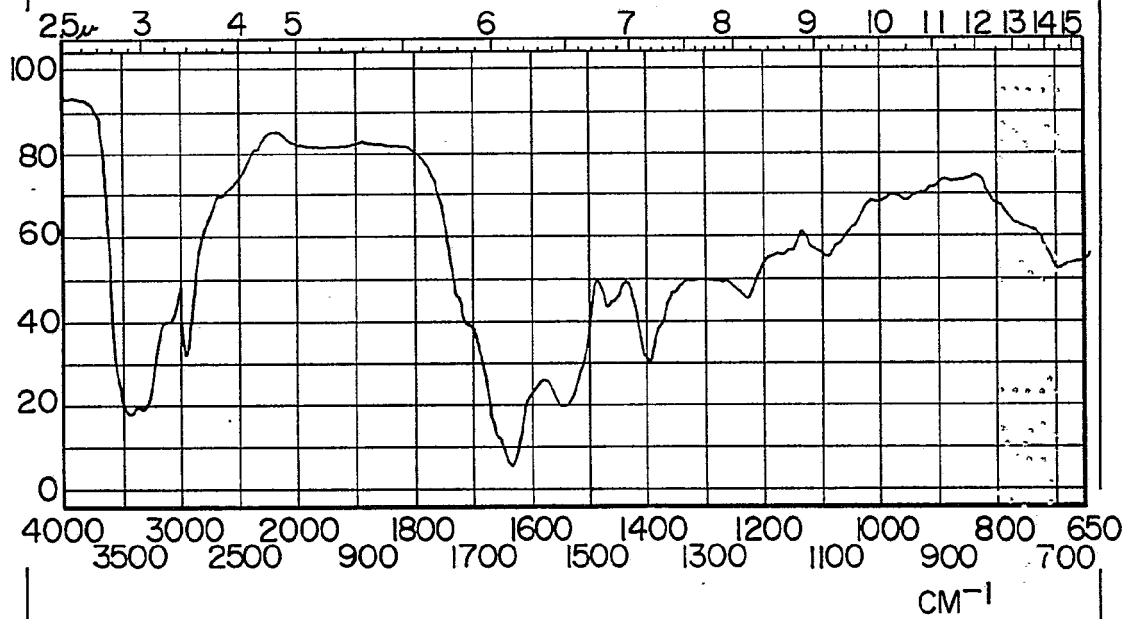
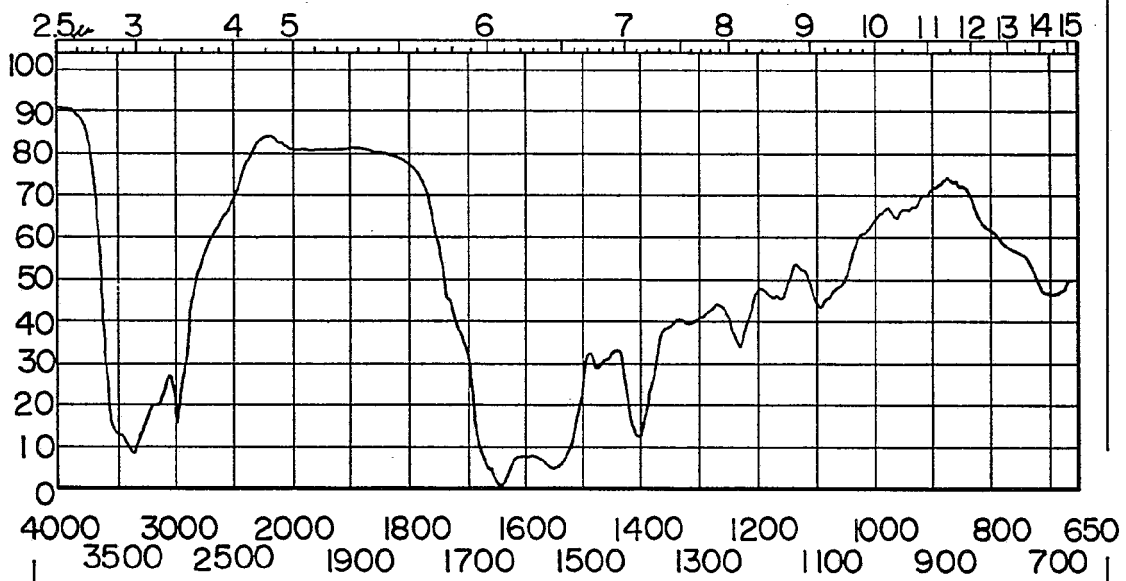


FIG. 4



ESCALA VARIABLE CM<sup>-1</sup>  
MADRID, 31 DE Marzo DE 1978  
RICARDO UMBIA  
P. II

FIG.5

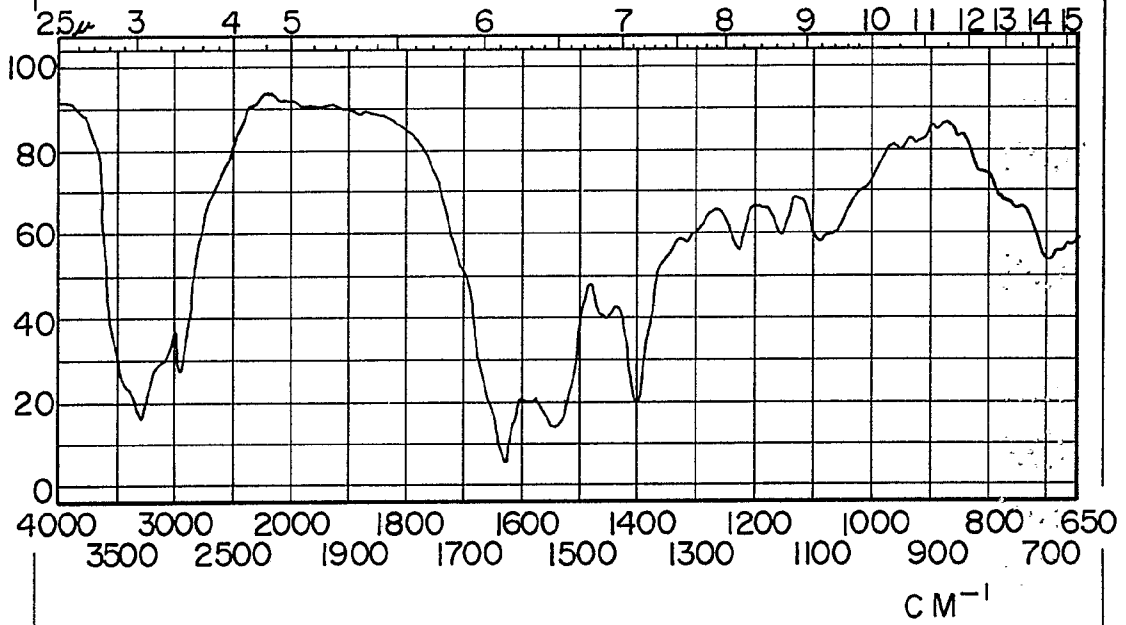


FIG.6

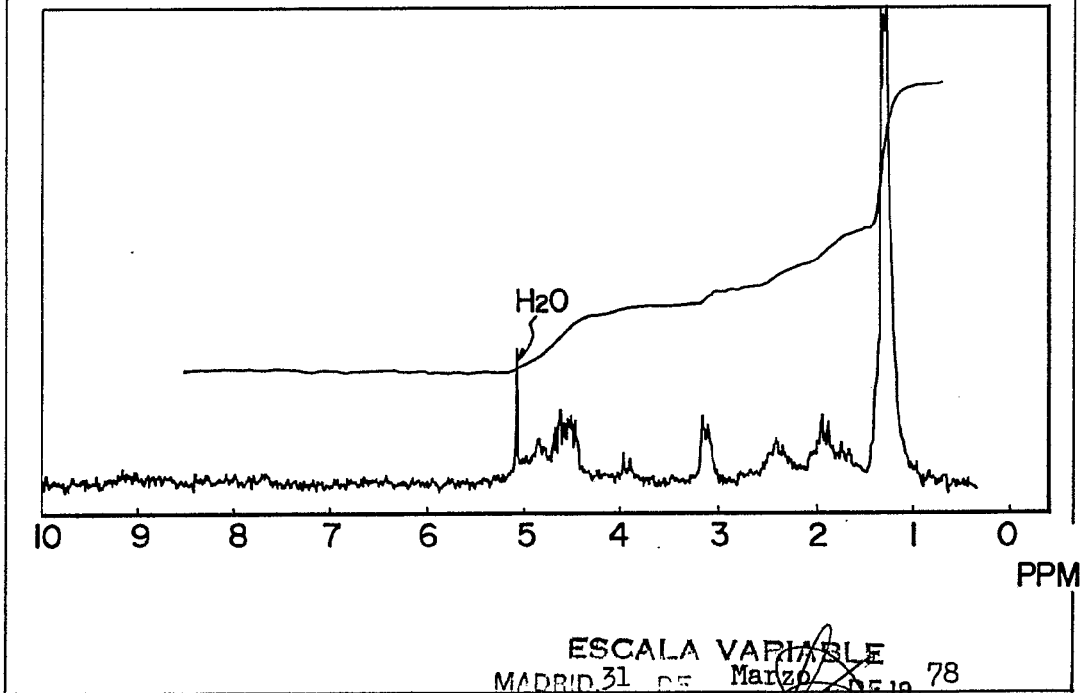




FIG.9

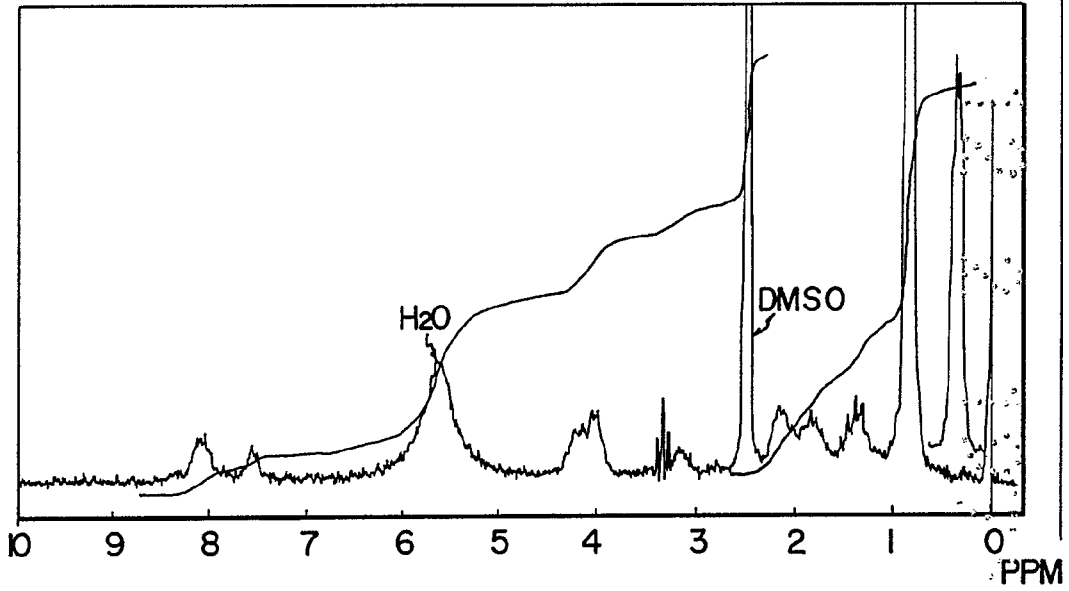
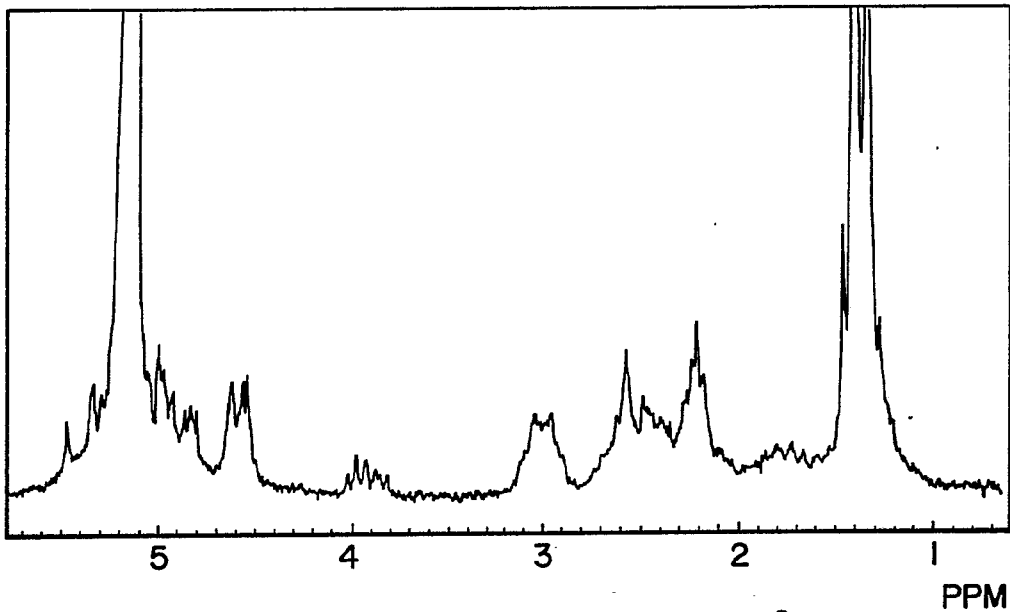


FIG.10



ESCALA VARIABLE  
MADRID, 31 DE Marzo DE 1978  
BERNARDO URBEL  
D. P.

FIG.11

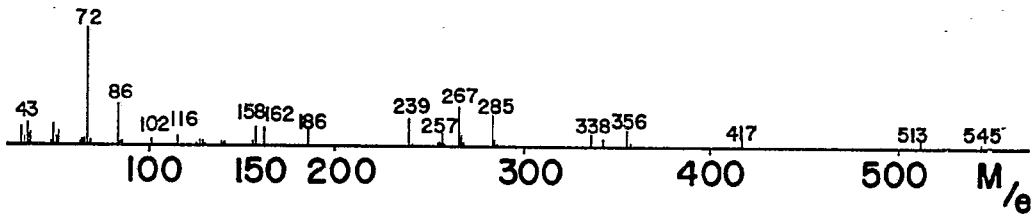
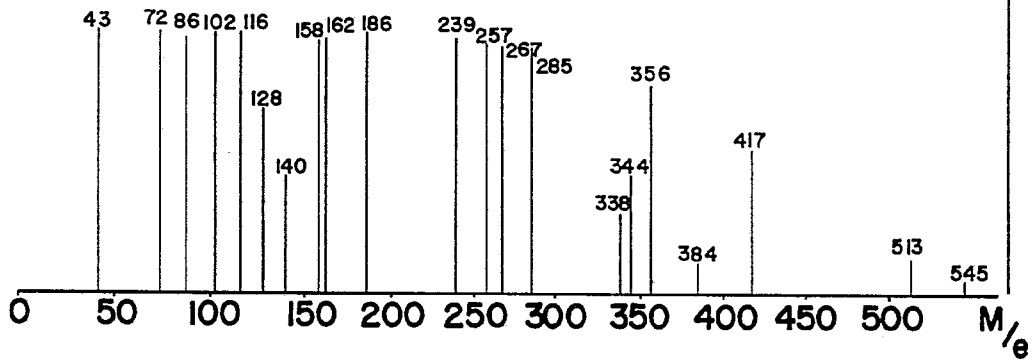


FIG.12



ESCALA VARIABLE  
MADRID, 31 DE Marzo DE 19 78  
BERNARDO ANTONIA  
P. P.

FIG.13

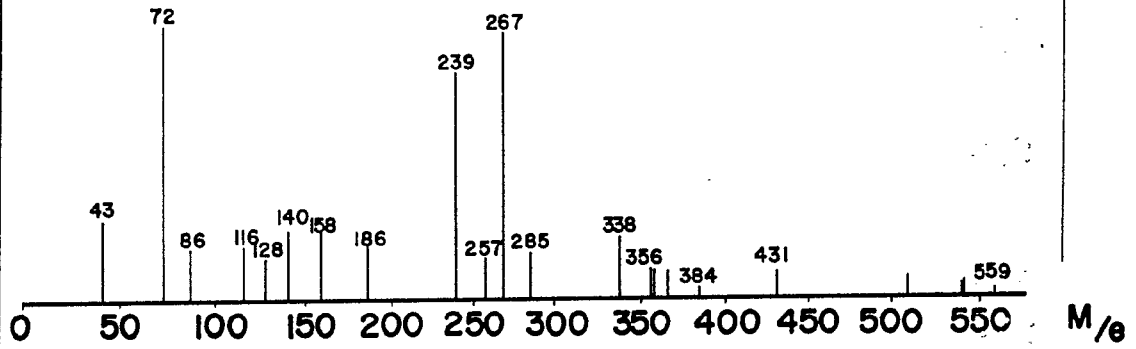


FIG.14

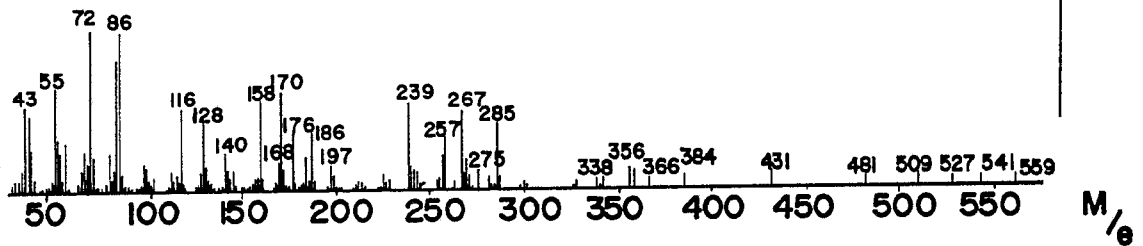
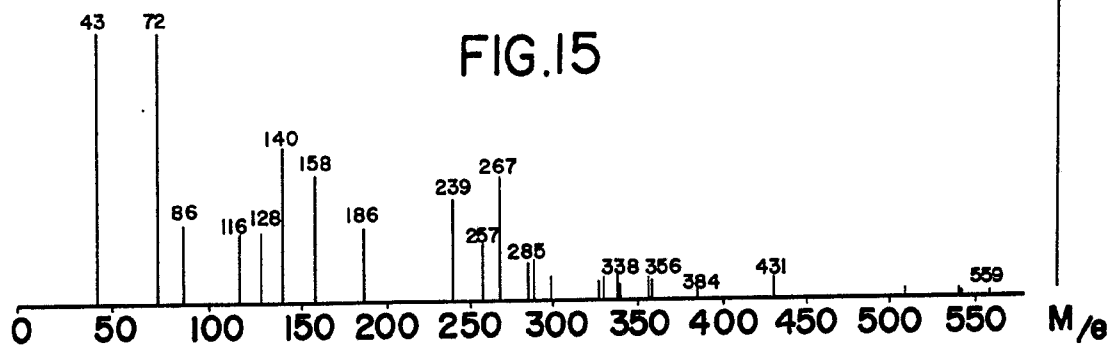


FIG.15



ESCALA VARIABLE  
MADRID, 31 DE Mayo de 1978  
BERNARDO ULLA  
P. P.