

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



Concedido el Registro de ⁽¹⁹⁾ ES ⁽¹¹⁾ ⁽²¹⁾ con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

NUMERO	476.430
FECHA DE PRESENTACION	28-12-78

(10) A 1

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
52-157416	28 de diciembre 1.977	JAPON

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07C; A61K	

(54) TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR ANTIBIOTICOS DE TIPO PEPTIDO DE CADENA RECTA.

(71) SOLICITANTE (S)
KAKENYAKU KAKO CO-, LTD.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
4-7, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo, Japon.

(72) INVENTOR (ES)
Shigeji Kondo.

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE
GOMEZ-ACEBO

La presente invención se relaciona con un procedimiento para preparar el antibiótico K 582 M de tipo péptido, de cadena recta, que consiste en arginina 1, treonina 1, tirosina 1, ornitina 2, hidroxarginina m, lisina n como componentes aminoácidos, por cultivo de un microorganismo productor de K 582 M.

De un modo más específico, la presente invención se refiere a la producción de un medio cultivado mediante el cultivo de un microorganismo productor de K 582 M que pertenece al género *Metarhizium* y una mezcla de K 582 M - A y - B obtenida a partir del medio cultivado y además K 582 M - A y K 582 M - B obtenido por separación de dicha mezcla de K 582 M - A y B.

La presente invención se relaciona con un procedimiento para preparar un antibiótico K 582 M de tipo péptido de cadena recta que comprende K 582 M - A y K 582 M - B, que producen un efecto antibiótico, un efecto inhibidor de tumores y otros efectos biológicos. El antibiótico K 582 M, descrito en la presente memoria, es un antibiótico nuevo de tipo péptido de cadena recta compuesto por arginina: 1, treonina: 1, tirosina: 1, ornitina: 2, Hidroxarginina: m, y lisina: n como componentes aminoácidos así como sus sales. El antibiótico 582 M - A, que se describirá más adelante, es K 582 M en el cual m de hidroxarginina y n de lisina corresponden a 1 y 1, respectivamente y K 582 M - B es K 582 M donde m de hidroxarginina y n de lisina corresponden a 2 y 0, respectivamente.

Las figuras 1 y 2 representan el espectro IR de K 582 M - A (hidrocloruro) y K 582 M - B (hidrocloruro) respectivamente.

Las figuras 3 y 4 representan el espectro UV de K 582 M - A (hidrocloruro) y K 582 M - B (hidrocloruro) respectivamente.

Las figuras 5 y 6 representan el espectro C^{13} -NMR de K 582 M - A (hidrocloruro) y K 582 M - B (hidrocloruro) respectivamente.

5 La figura 7 representa el espectro IR de K 582 M - A (sulfato).

En el medio cultivado de una cadena que pertenece al género *Metarhizium* utilizado como microorganismo de K 582 M, por ejemplo, *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. var. *anisopliae* 582 M, se depositan sustancias eficaces para inhibir el desarrollo de diversos hongos verdaderos, especialmente *Candida* y las demás levaduras y también sustancias eficaces para el virus como el virus de polio, gripe, etc, y eficaces para tumores de animales experimentales.

15 La presente invención se ha obtenido por el aislamiento satisfactorio de estas dos sustancias que tienen características similares como nuevas sustancias activa de tipo péptido a partir del medio cultivado.

La cepa *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. var. *anisopliae* 582 M se ha depositado con Kogyogijutsuin-Biseibutsu-Kogyo-Gijutsu-Kenkyujo (Japón) como FERM-P Nº 4217 el 25 de noviembre de 1977 y con ATCC como ATCC Nº 20500 el 27 de diciembre de 1977. Las características taxonómicas de esta cepa se exponen a continuación:

Observación macroscópica

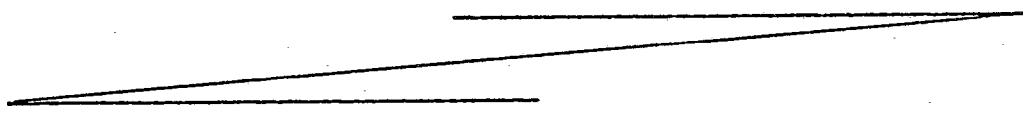
25 El desarrollo de la colonia sobre agar de extracto de malta es rápido y alcanza hasta un diámetro de 4,5-5,0 cm después de dos semanas a 25°C. Presenta una cierta forma de haz. Es plana y en ocasiones arracimada radialmente. El color de la colonia es del verde grisáceo oscuro al verde amarillento en la parte central formadora de espora y blanco en el margen. A veces

las partes verdes y las partes blancas se entremezclan o forman franjas. Su lado posterior representa desde el amarillo algal hasta un color crema y no se reconoce fluido secretor. Tiene un olor estimulante semejante al olor perteneciente al género Streptomyces.

Observación microscópica:

El Mycelio es incoloro y tiene ceptos y ramificaciones. La Conidiofora es corta, incolora y tiene septos. Presenta una forma simple o ramificada. En lugar de presentar una forma simple, se forma finalizando en una forma finamente ramificada como el Penicillio y finalmente forma una masa semejando "tierras de fuego" (ramificación de un extremo acabado en punta). La construcción cilíndrica consiste en desarrollos de conidio en la parte que forma una capa suelta. La "tierra de fuego" es larga y esbelta en forma cilíndrica que es incolora y sus extremos aguzados se vuelven más esbeltos. Más lejos en sus extremos se conectan con cadenas largas de conidio y constituyen un conjunto cilíndrico largo por conexión entre sí. El conidio es del tipo de la herospora plana monocelular y representa un tono de color verde amarillento pálido que tiene forma cilíndrica o una forma elipsoidal larga y cuatro esquinas están redondeadas. La longitud y la anchura son 4,0 - 8,0 μ y 2,0 - 2,5 μ , respectivamente, pero normalmente son del orden de 5,0 - 7,0 μ . La Candida está compuesta centripetamente para formar cadenas múltiples y por adherencia mutua para establecer un cilindro alto de color verde grisáceo.

Sus propiedades en diversos medios de cultivo con agar se indican a continuación:



Aspecto en los diversos medios de cultivo con agar (28°C)

	Desarrollo	Condiciones de desarrollo			Formación de esporas y su color	Pigmento	Gota de agua
		Forma	Margen	Arroyamiento			
Czapek-pepton-Agar	Bueno	Forma de cogín	Ciliar	En espiral	De verde amarillento a verde oscuro	Produce	Ninguno
Czapek-Dox-Agar	Bueno	Forma de botón	Lóbulo pequeño	En espiral	De verde amarillento a verde oscuro	Produce	Ninguno
Saburo-Agar	Bueno	Forma de cogín	Ciliar	En espiral	De verde amarillento a verde oscuro	Produce	Ninguno
Harina de maíz-Agar	Bueno	Ensayo de micelio en planitud	Forma de dientes en conjunto irregular	Ninguno	Verde oscuro	Ninguno	Ninguno
Malta-Agar	Algo deficiente (por fusiblemente extendido)	El micelio forma planitud delgada	Onda	Ninguno	Verde amarillento a verde oscuro	Produce	Ninguno
Patata-Dextrosa-Agar	Algo deficiente	El micelio es delgado y plano	Ciliar	Ninguno	Verde oscuro	Produce	Ninguno
Gelatina-Agar	Algo deficiente	El micelio es delgado y plano	Onda	Ninguno	Verde oscuro	Ninguno	Ninguno
Agar ordinario	Algo deficiente	El micelio tiene forma de gruesos copos de nieve	Onda	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno

Aspecto en los diversos medios de cultivo

	Desarrollo	Condiciones de desarrollo			Forma y su
		Forma	Margen	Arroyamiento	
Czapek-pepton-Agar	Bueno	Forma de cogín	Ciliar	En espiral	De v a ve
Czapek-Dox-Agar	Bueno	Forma de botón	Lóbulo pequeño	En espiral	De v a ve
Saburo-Agar	Bueno	Forma de cojín	Ciliar	En espiral	De v a ve
Harina de maíz-Agar	Bueno	Ensayo de micelio en planitud	Forma de dientes en conjunto irregular	Ninguno	Verd
Malta-Agar	Algo deficiente (profusamente extendido)	El micelio forma planitud delgada	Onda	Ninguno	Verd verd
Patata-Dextrosa-Agar	Algo deficiente	El micelio es delgado y plano	Ciliar	Ninguno	Verd
Gelatina-Agar	Algo deficiente	El micelio es delgado y plano	Onda	Ninguno	Verd
Agar ordinario	Algo deficiente	El micelio tiene forma de gruesos copos de nieve	Onda	Ninguno	Ni:

de cultivo con agar (28°C)

Formación de esporas y su color	Pigmento	Gota de agua
De verde amarillento a verde oscuro	Produce	Ninguno
De verde amarillento a verde oscuro	Produce	Ninguno
De verde amarillento a verde oscuro	Produce	Ninguno
Verde oscuro	Ninguno	Ninguno
Verde amarillento a verde oscuro	Produce	Ninguno
Verde oscuro	Produce	Ninguno
Verde oscuro	Ninguno	Ninguno
Ninguno	Ninguno	Ninguno

En el cultivo según la invención se pueden aplicar conocimientos generales con respecto al cultivo de hongos. Respecto al medio de cultivo y fuentes nutritivas, se pueden emplear varias clases; no obstante, como fuentes de carbono se utilizan preferiblemente azúcares como la dextrosa, sacarosa, levulosa, manosa, glicerina, almidones, maltosa, xilosa, lactosa, molazas, mannan. Respecto a fuentes de nitrógeno se pueden emplear sales inorgánicas como nitrato de sodio, nitrato de amonio, cloruro de amonio, etc, así como fuentes orgánicas de nitrógeno como caldo, peptona, licor de infusión de maíz, extracto de levadura, harina de habas de soja, harina de cacahuete, aminoácidos, etc. En algunos casos se pueden emplear otras sales inorgánicas apropiada y agentes abyuventes.

Con respecto al método de cultivo, aún cuando se cultiva sobre un medio de cultivo sólido, la producción de K 582 M se puede reconocer como conveniente en un medio de cultivo líquido para la producción a gran escala.

El cultivo se realiza aerodicamente a una temperatura comprendida entre 20 y 37°C, preferiblemente entre 28 y 30°C y un valor de pH entre 3,0 y 8,0, preferiblemente entre 5,4 y 5,6. Si fuera necesario se puede añadir un desespumante en cualquier estadio apropiado.

Para recoger el K 582 M del medio cultivado después de completarse la fermentación, se puede aplicar un proceso utilizado en general para recoger los productos de fermentación, por ejemplo, un proceso de precipitación por un disolvente orgánico hidrófilo, por ejemplo, etanol, acetona, etc, un proceso de precipitación por un ácido orgánico, por ejemplo, ácido pícrico, ácido flaviánico, etc, un proceso de precipitación por una sustancia química, por ejemplo, ácido fosfotungustico, pen-

taclorofenol sódico, benzoaldehído, etc, un proceso de extracción por metanol o por varias clases de absorbente activo y también un proceso de purificación aplicando un vehículo de intercambio iónico, cromatografía de tamiz molecular, un proceso de orientación de densidad, un proceso de distribución en contracorriente, un proceso de fraccionación por sales, disolventes o iones metálicos, un proceso de electroforesis, un proceso de aislamiento por la formación de una sustancia compleja y una combinación apropiada de los mismos para obtener la sustancia pretendida.

Por ejemplo, la sustancia perseguida se puede separar fácilmente por un procedimiento que combina la precipitación con la purificación por una resina de intercambio iónico, cuyo procedimiento comprende las fases de filtración por adición de un adyuvante de filtro, tratamiento del filtrado con una resina ácida de intercambio iónico o una resina básica de intercambio iónico y después elución con un ácido álcali.

El concentrado así obtenido por el empleo de la resina de intercambio iónico se concentra aún más, y se añade después con cantidades apropiadas de etanol y acetona para producir crudo de una mezcla de K 582 M - A y B. El nuevo crudo así obtenido se trata de un modo adicional con metanol, alúmina, carbón activo, cromatografía de tamiz molecular, y así sucesivamente, para obtener un producto purificado.

La mezcla de K 582 M - A y B así obtenida contiene dichos K 582 M - A y K 582 M - B y presenta propiedades como si ambos existieran juntos en propiedades fisicoquímicas y también tiene efectos fisiológicos con actividad antibiótica, actividad de inhibición de tumores, efectos de aceleración e inhibición de inmunidad, efectos de inducción de interferencia, y así su-

cesivamente.

El producto purificado así obtenido o el caldo o elui-
do cultivado obtenido por el vehículo de intercambio iónico,
etc, a partir del caldo de cultivo se pueden tratar con diver-
5 sos procesos cromatográficos, por ejemplo, mediante el empleo
de gel de poliacrilamida, CM-Cephadex, etc para aislar K 582 M-
A y K 582 M - B. A partir del K 582 M - A y K 582 M - B así ob-
tenidos se pueden obtener productos más purificados empleando
diversas clases de purificación, respectivamente.

10 Las propiedades fisicoquímicas del K 582 M - A y K 582
M - B así obtenidas se indican como sigue:

	K 382 M - A (sal de HCl)	K 582 M - B (sal de HCl)
	1. Análisis elemental	
15	C: 39,35	C: 36,25
	H: 7,24	H: 6,61
	N: 18,03	N: 18,62
	C: 15,83	C: 14,06
	2. Peso molecular (medido por los tres métodos mencionados a	
20	continuación; no obstante, como estos métodos dan un amplio	
	error en la gama de pesos moleculares mencionada a continuación,	
	las características de las sustancias según la invención no que-	
	dan restringidas por los valores de peso molecular medidos men-	
	cionados a continuación)	
25	Aproximadamente 1300 (Proceso de filtración por gel)	Aproximadamente 1200 (Proce- so de filtra- ción por gel)
30	Aproximadamente 1300 (Método del punto de conge- lación)	Aproximadamente 1220 (Método del punto de conge- lación)

	Aproximadamente 1200 (Método de presión <u>ga</u> seosa)	Aproximadamente 1200 (Método de presión <u>ga</u> seosa)
	3. Temperatura de fusión	
5	192 - 198 ^o C (descomposición)	197 - 203 ^o C (descomposición)
	4. Potencia rotativa específica (como estos valores cambian <u>am</u> pliamente de acuerdo con las condiciones de la medición, las características de las sustancias según la invención no han de tomarse en sentido restrictivo):	
10	$[\alpha]_D^{22} = +0,2^o$ (C= 1%, H ₂ O)	$[\alpha]_D^{22} = +0,6^o$ (C=1%, E ₂ O)
	5. Espectro infrarrojo	
	K 582 M - A (hidrocloruro)	K 582 M - B (hidrocloruro)
	Figura 1	Figura 2
	6. Espectro de absorción de ultravioletas	
15	Figura 3	Figura 4
	7. Espectro de C ¹³ -NMR	
	Figura 5	Figura 6
	8. Solubilidad	
	(1) Hidrocloruro	
20	Fácilmente soluble en agua, metanol, difícilmente soluble en etanol. Insoluble en éter, éter de petróleo, butanol, cloroformo, benceno	
25	(2) Sulfato (se ilustra la solubilidad especial de sulfatos	
	Fácilmente soluble en agua, difícilmente soluble en metanol. Insoluble en los otros disolventes.	Igual que a la izquierda

5	<p>9. Reacción del color:</p> <p>Reacción de Ninhidrina + Reacción de Xantoprotei- na + Reacción de Millón + Reacción de Sakaguchi + Reacción de Pauly + Reacción de Molisch - Reacción de Tollen-Orcin - Reacción de Na-nitroprusido -</p>	<p>Igual que en la izquierda</p>
10	<p>10. Naturaleza (como base libre)</p> <p>Sustancia básica</p>	<p>Igual que a la izquierda</p>
	<p>11. Color</p> <p>Polvo amorfo blanco</p>	<p>Igual que a la izquierda</p>
15	<p>12. Reacción de precipitación</p> <p>La precipitación tiene lugar por adición de los reactivos menciona dos a continuación: tungstato de fósforo, ácido pictrico, ácido flavínico, pentaclorofenol, ben zaldehído.</p>	
20	<p>13. Estabilidad</p> <p>Estable en reacción ácida y neutra. Algo inestable en reacción básica</p>	<p>Igual que a la izquierda</p>
25	<p>14. Composición después de la hidrólisis con ácido clorhídrico</p> <p>(Relación molar)</p> <p>Arginina 1 Treonina 1 Hidroxiarginina 1 Tirosina 1</p>	<p>(Relación molar)</p> <p>Arginina 1 Treonina Hidroxiarginina 2 Tirosina 1</p>
30		

	(Relación molar)		(Relación molar)
Ornitina	2	Ornitina	2
Lisina	1	Lisina	0

15. Aminoácidos terminales

5 Terminal C (proceso de digestión de hidrazina)

Tirosina | Tirosina

Terminal N (método de Dancilación)

Arginina | Arginina

10 Actividades biológicas de K 582 M - A y K 582 M - B, siendo ambas la sal de HCl.

1. Efectos antibióticos de K 582 M - A y K 582 M - B (Método de dilución)

Microorganismos ensayados	Concentración mínima que inhibe el desarrollo (mc g/ml)	
	K 582 M - A	K 582 M - B
15 Candida albicans	0,2	0,4
" tropicalis	0,2	0,4
" pseudotropicalis	0,2	0,4
" utilis	0,2	0,4
20 " guilliermondii	0,2	0,4
" krusei	0,2	0,4
Saccharomyces cerevisiae Br-60	0,2	0,4
Saccharomyces rouxii bottlucue	0,2	0,4
25 Zygosaccharomyces salsus	0,2	0,4
Willia anomala	0,2	0,4
Torulaspora delbrückii	0,2	0,4
Rhodoturolo lupra	0,2	0,4
Mycoturolo	0,2	0,4
30 Debaryomyces kloecheri	0,2	0,4

Microorganismos ensayados	Concentración mínima que inhibe el desarrollo (mc g/ml)	
	K 582 M - A	K 582 M - B
5 Pullularia pullulans	0,2	0,4
Proteus OX-19	20	40
Bacillus subtilis	> 100	> 100
Staphylococcus aureus 209-P	> 100	> 100
Escherichia coli	> 100	> 100
10 Shigella sonnei	> 100	> 100
Sarcina lutea Hata	> 100	> 100
Bacillus mycoides	> 100	> 100
Mycobacterium cymote	> 1000	> 1000
Mycobacterium Smegmatis	> 1000	> 1000
Mycobacterium H ₃₇ RV	> 1000	> 1000
15 Trichohyton asteroide	> 1000	> 1000
Trichohyton lpulam	> 1000	> 1000
Trichomonas vaginalis	> 1000	> 1000

Según se podrá ver por lo expuesto anteriormente, K 582 M - A y K 582 M - B presentan una fuerte actividad anti-biótica contra los microorganismos Candida y otras levaduras.

2. Caracteres tóxicos agudos de K 582 M - A y K 582 M - B.

Vía		Ratón LD ₅₀ mg/kg	
		K 582 M - A	K 582 M - B
25 Administración intravenosa	♂	120 - 144	24,1 - 34,8
	♀	144 - 1278	24,1 - 34,8
Administración intraperitoneal	♂	por encima de 300	43,2 - 57,2
	♀	por encima de 300	43,2 - 57,2

Continuación

Vía		Ratón LD ₅₀ mg/kg	
		K 582 M - A	K 582 M - B
Administración subcutanea	♂	320 o más	86,8 - 104
	♀	320 o más	104 - 125
Administración oral	♂	por encima de 6000	2400 - 3000
	♀	por encima de 6000	2400 - 3000

5

10

3. Efectos de inhibición de tumores de K 582 M - A y K 582 M - B.

(a) Efectos de inhibición de tumores con ratas portadoras de tumores.

15

Se transplantó 10^7 de células de cancer de hígado de ascitis AH 44 y AH 66, respectivamente, en grupos consistentes cada uno en diez ratas de origen Donryu (hembra: 150-200 gm), en la vena de la cola; después de haber transcurrido 72 horas se administró oralmente K 582 M - A ó K 582 M - B en una dosis de 30 mg/kg de una forma continua 10 veces y al cabo de 60

20

días se determinó la proporción de existencias de ratas. Según se podrá ver por la tabla siguiente, en cada grupos de ratas portadoras de tumor se reconocen efectos potentes de inhibición del tumor si se compara con el testigo al que solo se había administrado la dieta.

25

Grupo de animales	Proporción de existencia		
	Testigo	K 582 M-A	K 582 M-B
Células de tumor			
AH 44	0	100	50
AH 66	0	80	40

30

(b) Efectos de inhibición de tumores con ratones portadores de tumor.

Se transplantó 10^6 de células de cancer de ascitis de Ehrlichs, células de sarcoma S - 180 y células de cancer de ascitis leucémica SN 36, respectivamente, a grupos consisten-
 tes cada uno en 10 ratones de origen dd (hebra 2: $20 \text{ gm} \pm 1,0 \text{ gm}$), en la cavidad peritoneal del ratón y después de transcu-
 rridas 24 horas se administró K 582 M - A ó K 582 M- B en una
 dosis de 25 mg/kg/día por espacio de 10 días en la cavidad pe-
 ritoneal de los ratones respectivamente. Los resultados de es-
 te experimento, en los casos de las administraciones de los
 productos de la invención, presentaban potentes efectos de in-
 hibición del tumor (proporción de existencia al cabo de 60 días)
 según se indica en la tabla siguiente, mientras que en el caso
 del grupo testigo, los ratones habían muerto todos al cabo de
 unos 20 días.

Grupo de ratones Célula de tumor	Proporción de existencias en los ra- tones (%)		
	Testigo	K 582 M-A	K 582 M-B
Células de sarcoma S-180	0	90	90
Células de cancer de as- citis de Ehrlich	0	70	80
Células de cancer de as- citis leucémica SN 36	0	80	70

4. Otros efectos biológicos.

(a) Efectos contra el sistema inmune de un cuerpo vivo.

Se ha averiguado ahora, como resultado de diversos experimentos, que el K 582 M - A y K 582 M - B producen efectos de inmunidad del cuerpo vivo (en tanto en humoral como en celu-
 lar). Especialmente se ha podido averiguar ahora también que

las sustancias de la invención producen efectos de aceleración y de inhibición contra el sistema inmune en el método de valoración de la hemolisina por administración de SRBC (corpúsculos de sangre roja de oveja) y, por consiguiente, se indicará un ejemplo de dichos efectos del K 582 M - B más adelante.

Se administró a grupos consistentes cada uno de 5 - 10 ratones hembras de origen ddI el producto K 582 M - B en una dosis de 25 mg/kg, así como 2,5 mg/kg por día durante 4 días por vía intraperitoneal y se trasplantó 4×10^8 de SRBC en las venas de la cola y se continuó la administración de K 582 M-B durante otros 4 días y después de completarse la administración se midieron los valores de anticuerpos en sangre.

Un grupo de 25 mg/kg de administración presentó un 77 % de valor de anticuerpos basado en el grupo testigo y un grupo de 2,5 mg/kg de administración presentó 234 % de valor de anticuerpos basado en el grupo testigo y grupos de administración en mayor concentración presentaban tendencias de inhibir la inmunidad y grupos de administración de menor concentración presentaban una tendencia a acelerar la inmunidad.

(b) Acción de los efectos de tipo inductor de interferona.

Hemos averiguado ahora que cuando se administra K 582 M - A ó K 582 M - B en un cuerpo viviente, induce más unidades de interferona en la sangre. Por ejemplo, dichos efectos respecto al K 582 M - B se indicarán más adelante. Un ratón de origen dd recibió K 582 M - B por vía oral en una dosis de 2,5 mg/kg y se midió la concentración de interferona en la sangre en el curso del tiempo y al cabo de 25 horas presentó un valor máximo de 20×10^5 I.U. Esto demuestra efectos de inducción de interferona muy potentes de esta sustancia. Tales efectos se reconocen también con otros animales como las aves domésticas,

5 conejos, perros, cerdos, etc. En los experimentos de infección por virus de gripe en ratones, cuando se ha administrado 2 mg/kg de K 582 M - B por vía oral a los ratones en 12 o 24 horas antes de la infección, se presenta de un 30 a un 40 % de prolongación de la vida.

Las características de K 582 M - A y K 582 M - B, según se ha indicado anteriormente, demuestran con claridad que estas sustancias son sustancias nuevas que hemos podido obtener. Cuando se utiliza K 582 M - A (sal de H_2SO_4) ó K 582 M - B (sal de H_2SO_4) se obtienen resultados similares.

10 La presente invención se ilustra de un modo adicional por los ejemplos siguientes: no obstante, no ha de interpretarse restringida a lo expuesto y en tanto que se han presentado las diversas propiedades de la sustancia según la invención con total claridad, es evidente a los expertos en la materia que
15 aún cuando no se hubieran descrito prácticamente con respecto al alcance de la invención, los objetos de la invención se pueden conseguir también aplicando variaciones o medios alterados.

La presente invención se ilustra de un modo adicional en los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

(a) Se inocularon 200 cc de medio de cultivo líquido (pH aproximadamente 6) que tenían una composición de 3,0 % glucosa, 1,0 % polipeptona, 0,2 % nitrato de sodio, 0,1 % fosfato de dihidrógeno potásico, 0,05 % cloruro de potasio, 0,05 % sulfato de magnesio, 0,01 % sulfato ferroso con *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. var. *anisopliae* 582 M (Bikoken FERM-P Nº 4217, ATCC Nº 20500) y el cultivo con agitación se efectuó a 30°C por espacio de 14-20 días.

30 (b) Se repitió el procedimiento del ejemplo 1 (a),

excepto que en lugar de 1,0 % de polipeptona se añadió 0,1 % de aminoácido (glicina, asparagina, arginina, histidina, alanina y otros aplicados por separado).

Ejemplo 2

5 Se filtraron 5 litros de filtrado del caldo de cultivo obtenido en el ejemplo 1 con adicción de Hiflo-supercel.

Después de ajustar el valor de pH en 6,0-7,0, el filtrado obtenido se pasó a través de una columna de resina de intercambio iónico IRC-50 (H^+ , Na^+ en tipos mezclados) que tenía un diámetro interior de 20 mm y una altura de 500 mm para absorber las sustancias objetivas. La columna se lavó con agua, después se pasaron 500 cc de HCl de 1,0 N a un caudal de 10 cc/minuto para eluir las sustancias objetivas. El eluido se ajustó al valor de pH de 6,0 y después se concentró a presión reducida.

15 Se dejó que el concentrado reposara hasta el día siguiente a 35°C añadiendo pentaclorofenol sódico para dar por resultado una precipitación de mezcla de pentaclorofenolato de K 582 M-A y B. El pentaclorofenolato obtenido de K 582 M - A y B mezclados se lavó con agua, después se disolvió en butilacetato y la solución obtenida se extrajo dos veces con solución de ácido clorhídrico diluido de un valor de pH de 2,0-3,0 para obtener una solución acuosa de mezcla de K - 582 - M - A y B (sal de HCl). La solución acuosa se lavó varias veces con butilacetato y la capa acuosa se ajustó a un pH de 4,0 y después se concentró a presión reducida. El residuo se añadió con una cantidad suficiente de etanol para precipitar la mezcla de K 582 M - A y B (sal de HCl). Así, se obtuvieron 5,0 gm de polvo crudo de mezcla de K 582 M - A y B (sal de HCl).

25 El polvo obtenido se disolvió de nuevo en metanol y, 30 añadiendo una cantidad suficiente de acetona y etanol a la so-

lución de metanol, se precipitó una mezcla de K 582 M - A y B (sal de HCl), que se recogió por filtración. La mezcla de K 582 M - A y B (sal de HCl), así obtenida, se disolvió en metanol y se purificó utilizando una columna de Cephadex LH-20 para obtener 4,0 gm de K 582 M - A y B mezclados (sal de HCl) como un polvo blanco.

Ejemplo 3

Se disolvió 1 gm de mezcla de K 582 M - A y B (sal de HCl), obtenido por el procedimiento descrito en el ejemplo 2, en 5 cc de agua y la solución acuosa se trató con cromatografía utilizando una columna (diámetro interior de 26 mm, altura 1200 mm) de Biogel P-2 (malla de Nº 100-200). O sea, empleando una solución acuosa de NaCl 0,1 M, se eludió en la proporción de 30 cc/hora y en principio se obtuvo la fracción de K 582 M - A (sal de HCl) y después la fracción de K 582 M - B (sal de HCl). Los eluidos A y B, así obtenidos, se trataron cada uno con cromatografía y se concentraron a presión reducida. Se añadió una mezcla de acetona y etanol (4:1) al residuo obtenido por precipitación y después de deshidratar, los precipitados obtenidos se extrajeron de una forma repetida con metanol. La solución de metanol se concentró a presión reducida y el residuo se precipitó por adicción de una mezcla de acetona y etanol (4:1), y se deshidrató para obtener polvo de K 582 M - A (sal de HCl) o polvo de K 582 M - B (sal de HCl). Después el polvo A y el polvo B obtenidos se disolvieron cada uno en una pequeña cantidad de metanol al 80 % y la solución de metanol se purificó por desalación con cromatografía utilizando la columna (diámetro interior 26 mm, altura 1200 mm) de Cephadex LH-20, el eluido obtenido se concentró a presión reducida y el residuo se precipitó con una mezcla de acetona y etanol (4:1).

Los precipitados se deshidrataron y, por lo tanto, se obtuvieron, respectivamente 0,41 gm de K 582 M - A (sal de HCl) (rendimiento 41,0 %) y 0,35 gm de K 582 M - B (sal de HCl) (rendimiento 35,0 %).

5 Ejemplo 4

Se disolvió 1 gm de K 582 M - A y B (sal de HCl) obtenido por el procedimiento del ejemplo 2 en 5 cc de agua y la solución acuosa se trató con cromatografía empleando una columna (diámetro interior 20 mm, altura 500 mm) de CM-Cephadex C-25 (malla N° 100-200). La cromatografía se llevó a cabo en primer lugar con tampón de ácido fosfórico 0,1 M (pH 6), después en solución de NaCl 0,4 M y después en solución de NaCl 0,9 M como disolvente de elución. Después de haber cambiado la elución a solución de NaCl 0,9 M, se eluyó primero K 582 M - A (sal de HCl) y después K 582 M - B (sal de HCl). Los eluidos de K 582 M - A (sal de HCl) y K 582 M - B (sal de HCl) se concentraron cada uno, se deshidrataron, se extractaron repetidamente y después la parte soluble en metanol se concentró y el residuo se precipitó por adicción de una mezcla de acetona y etanol (4:1) para obtener K 582 M - A (sal de HCl) y K 582 M - B (sal de HCl) en forma de polvo, respectivamente. El polvo A y el polvo B así obtenido se disolvieron cada uno en una pequeña cantidad de metanol acuoso al 80 % y la solución de metanol se purificó por desalación con cromatografía empleando una columna de Cephadex LH-20. Después de la concentración a presión reducida, el eluido se precipitó por adicción de una mezcla de acetona y etanol (4:1) y los precipitados se deshidrataron para obtener 0,40 gm de K 582 M - A (sal de HCl) purificado (rendimiento 40,0 %) y 0,43 gm de K 582 M - B (sal de HCl) purificado (rendimiento 43,0 %), respectivamente.

Ejemplo 5

Se filtraron 5 litros de medio cultivado obtenido por el procedimiento descrito en el ejemplo 1 con adicción de 100 gm de Hiflo-super-cel. El filtrado obtenido se ajustó a un valor de pH de 5,0-6,0, se concentró a un volumen de 1/10-1/20, se removieron las sales inorgánicas contenidas en el mismo, de nuevo se concentró hasta la sequedad y se extrajo con 200 cc de metanol, varias veces. El extracto combinado se concentró, y se extractó repetidamente con metanol reduciendo la cantidad de metanol cada vez, y los extractos se disolvieron completamente en una pequeña cantidad de agua y la solución acuosa obtenida se trató por cromatografía con una columna (diámetro interior 50 mm, altura 1000 mm) de Biogel P-2 (malla 100-200). O sea, se eluyó con solución de NaCl 0,1 M (caudal 30 cc/hora) para obtener en primer lugar la fracción de K 582 M - A (sal de HCl) y después la fracción de K 582 M-B (sal de HCl). Los eluidos de estas fracciones se purificaron cada uno por desalación de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 3 (extracción con metanol, adicción de una mezcla de acetona y etanol, tratamiento en columna de Cphadex LH-20) para obtener 1,4 gm de K 582 M - A seco (sal de HCl) y 1,2 gm de K 582 M-B seco (sal de HCl), respectivamente.

Ejemplo 6

Se filtraron 5 litros de medio cultivado obtenido según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 con adicción de Hiflo-super-cel. Después de la concentración a presión reducida el filtrado se filtró de la sustancia separada y se ajustó a un valor de pH de 5,0-7,0 y después se pasó a través de una columna (diámetro interior 20 mm, altura 1000 mm) de CM-Cephadex C-25 (malla N° 100-200) para adsorber las sustancias perse-

5 guidas. La columna se eluyó entonces en primer lugar con solución tampón de ácido fosfórico 0,1 M que tenía un pH de 6,0, después con una solución de NaCl 0,4 M y después con una solución de NaCl 0,9 M. Después de cambiar la solución de eluido a solución NaCl 0,9 M, se eluyeron primero K 582 M - A (sal de HCl) y en segundo lugar K 582 M - B (sal de HCl). Estos eluidos fraccionados, que contenían cada uno K 582 M - A (sal de HCl) y K 582 M - B (sal de CHL), respectivamente, se concentraron, se secaron, se desalaron por el procedimiento descrito en el ejemplo 4 (metanol), adición de una mezcla de acetona y etanol, tratamiento con columna de Cephadex LH-20 y se secaron y de este modo se obtuvieron 1,2 gm de K 582 M - A (sal de HCl) y 1,3 gm de K 582 M - B (sal de HCl) secos, respectivamente.

15 Ejemplo 7

Se disolvieron 2 gm de K 582 M - A (hidrocloruro) obtenido por el método del ejemplo 3 ó 4 en 5 cc de agua destilada y se aplicó a una columna de IRC-50 (4 x 25 cm). Después de haberse lavado la columna con 400 cc de agua destilada, se eluyó K 582 M - A (sulfato) con H_2SO_4 1N. El eluido que contenía K 582 M - A (sulfato) se añadió a IRA-400. Después de ajustar la mezcla a un valor de pH de 6,0, se filtró y se concentró. El concentrado se añadió a una mezcla de acetona: EtOH (4:1) y los precipitados separados se filtraron. El K 582 M-A (sulfato) obtenido se trató con refinado de desalación por el empleo de una columna de Cephadex LH-20 (2,2 x 80 cm). Se empleó agua destilada para la elucción. Se obtuvieron 1,4 gm de K 582 M - A (sulfato) deshidratando por congelación el eluido resultante. Su espectro IR se representa en la figura 7. De un modo similar se puede obtener K 582 M - A (sulfato) por

tratamiento proporcional con el procedimiento indicado anteriormente.

Ejemplo 8 - Secuencia de aminoácido de K 582 M - A

5 Después de nuestro estudio sobre el análisis de aminoácido con respecto a K 582 M - A, hemos averiguado que K 582 M - A consiste en arginina, 1, γ -hidroxiarginina 1, ornitina 2, tronina 1, lisina 1 y tirosina 1 y el aminoácido terminal C es tirosina (método de descomposición de hidrazina).

10 Empleando el método de eliminación de Edman, la secuencia de aminoácido de K 582 M - A se analizó sucesivamente a partir del terminal N, o sea, se disolvieron 3 mg de K 582 M - A en 0,5 cc de agua y 1,0 cc de piridina y el pH se ajustó a 9,0-9,5 por adicción de NaOH 1N. Después de añadirse 100 μ l de fenilisocianato y de sustituirse el matraz con gas nitrógeno, el contenido del matraz se mantuvo a 40^o C por espacio de 90 minutos. Después de lacar con benzeno se deshidrató por congelación y el matraz se sustituyó con gas nitrógeno, cargado con 200 μ l de ácido trifluoracético y se mantuvo a 40^oC durante 15 minutos. Después de eliminar el ácido trifluoracético, se 20 tomó una parte del residuo y se hidrolizó a 110^oC por espacio de 22 horas por adicción de HCl 6N para analizar el aminoácido. Como resultado, se conformó que una arginina se desprende de K 582 M - A, o sea, el aminoácido del terminal N es arginina.

25 Empleando el método de eliminación de Edman mencionado, la secuencia de aminoácido del aminoácido del terminal N al tercer aminoácido del mismo en K 582 M - A se analizó sucesivamente y se confirmó que era arginina- γ -hidroarginina-ornitina.

30 Después de calentar a 55^oC por espacio de 24 horas en ácido trifluoracético seguido por eliminación de ácido trifluoracético, se sometieron 50 mg de K 582 M - A a electroforesis en

filtro de papel a alta presión. Además del K 582 M - A, se reconocieron dos sustancias positivas de ninhidrina y una de estas era positiva en la reacción de Sakaguchi. Cuando se filtró con gel el producto de descomposición de ácido trifluoroacético a una fracción de 1 cc en columna de Cephadex LH-20 (tamaño de la columna: 18 x 840 mm; disolvente: metanol al 80 %), se eluyó K 582 M - A y sustancia positiva en ninhidrina y sustancia positiva en reacción de Sakaguchi como una mezcla en las fracciones N° 136-154.

También se eluyó una sustancia positiva en ninhidrina y positiva en reacción de Sakaguchi como una sustancia única en las fracciones N° 156-164. Después del análisis de esta sustancia eluida en las fracciones N° 156-164, se averiguó que consistía en arginina 1 y γ -hidroxiarginina 1. Después de la concentración, las fracciones N° 136-154 se absorbieron en columna de CM-celulosa equilibrada con acetato amónico 0,01 M (tamaño de la columna: 17 x 160 mm y se sometieron a elucción gradiente empleando solución acuosa de NaCl 2M a una fracción de 1,5 cc para eluir una sustancia positiva en ninhidrina y negativa en reacción de Sakaguchi en las fracciones N° 220-233. Se eluyó también K 582 M - A en las fracciones N° 302-328. Las fracciones N° 220-230 se desalaron con Cephadex LH-20 metanol al 80%) y después del análisis del aminoácido se obtuvo la composición de aminoácido de ornitina 2, treonina 1, lisina 1 y tirosina 1. Se averiguó además por el método de descomposición con hidrazina que el aminoácido terminal C es tirosina.

Las fracciones N° 220-230 se emplearon para analizar sucesivamente la secuencia de aminoácido a partir del terminal N, o sea 2 mg de las fracciones N° 220-233 se disolvieron en 0,2 cc de agua y 0,3 cc de piridina y se ajustó a un valor de

pH de 9,0-9,5. Se añadieron 100 μ l de fenilisocianato y el matraz se sustituyó con gas nitrógeno y se mantuvo a 40°C durante 90 minutos. Después de lavar con benceno, se deshidrató por congelación y el matraz se sustituyó con gas nitrógeno, se cargó con 200 μ l de ácido trifluoracético, y se mantuvo a 40°C por espacio de 15 minutos. Después de eliminar el ácido trifluoracético, se tomó una parte del residuo y se hidrolizó a 110°C por espacio de 22 horas por la acción de HCl 6N para analizar el aminoácido. Como resultado se pudo confirmar que una ornitina se desprendía de las fracciones N^o 220-233, o sea, el aminoácido terminal N de las fracciones 220-233 era ornitina.

Empleando el método de eliminación de Edman mencionado anteriormente, se analizó la secuencia de aminoácido de las fracciones N^o 220-233 en sucesión comenzando a partir del terminal N y se confirmó que era ornitina-treonina-ornitina-lisina-tirosina.

Partiendo de los resultados mencionados se determinó que la secuencia de aminoácidos de K 582 M - A era arginina- γ -hidroxiarginina-ornitina-treonina-ornitina-lisina-tirosina.

Ejemplo 9 - Secuencia de aminoácidos de K 582 M - B

El análisis de aminoácidos de K 582 M - B demuestra que sus componentes de aminoácidos son arginina 1, γ -hidroxiarginina 2-ornitina 2-treonina 1 y tirosina 1, y la descomposición con hidrazina indica que el aminoácido terminal C es tirosina.

Empleando el método de eliminación de Edman, se determinó el aminoácido del terminal N de K 582 M - B. O sea, se disolvió 1 mg de K 582 M - B en 0,2 cc de agua y 0,3 cc de piridina y se ajustó a un valor de 9,0 - 9,5 por adicción de

NaOH 1 N. Después se añadieron 100 μ l de fenilisocianato y el matraz se sustituyó con gas nitrógeno y se mantuvo a 40^o C por espacio de 90 minutos. Después de lavar con benceno, se deshidrató por congelación y el matraz se sustituyó con gas nitrógeno, se cargó con 200 μ l de ácido trifluoracético y se mantuvo a 40^o C por espacio de 15 minutos. Después de eliminar el ácido trifluoracético, se tomó una parte del residuo, se hidrolizó a 110^o C por espacio de 22 horas por adición de HCl 6N para analizar el aminoácido. Como resultado se confirmó que una arginina se desprendía de K 582 M - B, o sea el aminoácido terminal N es arginina.

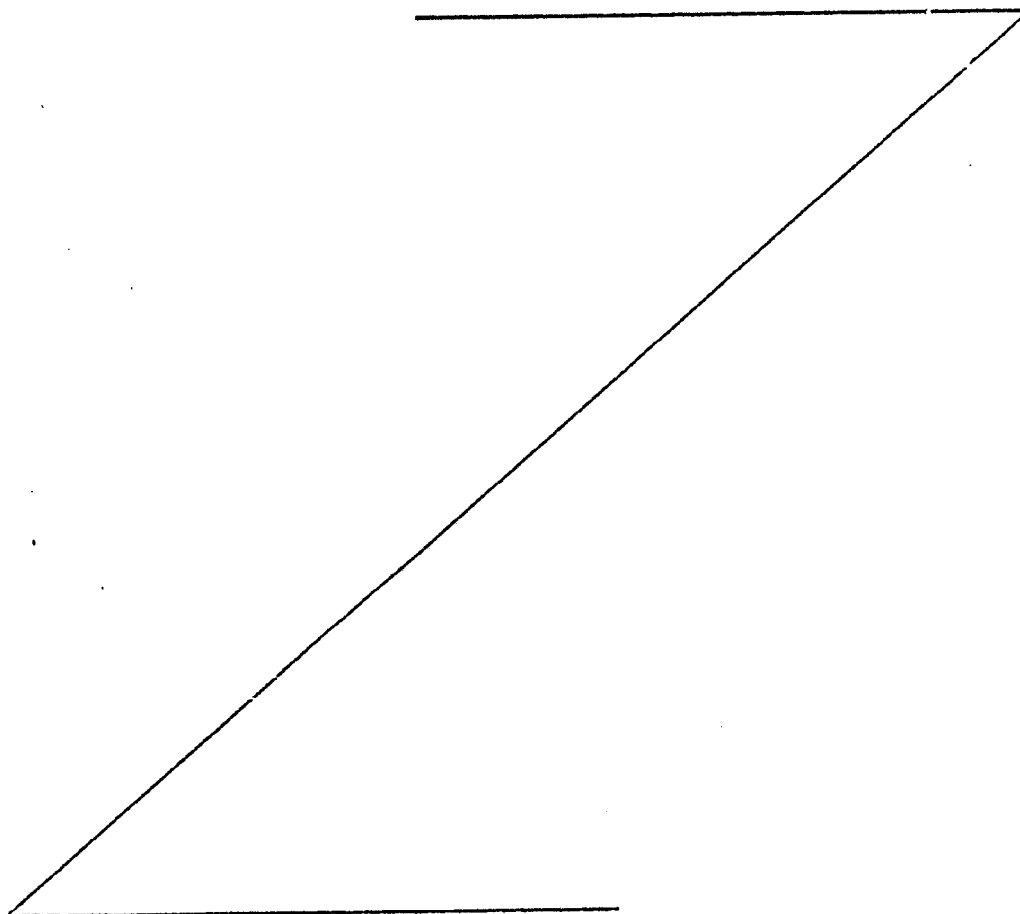
Se calentaron 100 mg de K 582 M - B en ácido trifluoracético a 40^o C por espacio de 9 horas. Después de eliminar el ácido trifluoracético, se sometió a filtración por gel empleando una columna de Sephadex LH-20 (tamaño de la columna: 18x970 mm; disolvente: agua), en la cual después de diluir 105 cc del eluido inicial se recogieron fracciones en una proporción de 1,15 cc por fracción. Como resultado se eluyó una mezcla en las fracciones N^o 40-83 y un dipéptido consistente en arginina 1 e hidroxarginina 1 como componentes de aminoácido en las fracciones N^o 84-92, así como tirosina en las fracciones N^o 114-134. Después de la concentración, las fracciones N^o 40-83 se adsorbieron en una columna de celulosa CM (tamaño de la columna: 15 x 600 mm) equilibrado con acetato amónico 0,01 M y después se trató con elución gradiente a 1,0 cc/fracción empleando NaCl 1M. En las fracciones N^o 191-204 se eluyó un tetrapéptido que, por el análisis de aminoácidos, se averiguó que consistía en ornitina 2, teronina 1 e hidroxarginina 1.

Empleando el método de eliminación de Edman, se analizaron las fracciones N^o 191-204 en las mismas condiciones que

K 582 M - B para clarificar la secuencia de aminoácidos, sucesivamente. Como resultado, se determinó que las fracciones N^o 191-204 eran un tetrapéptido que tenía la secuencia de aminoácido de ornitina-treonina-ornitina- γ -hidroxiarginina.

5 Partiendo de los resultados mencionados anteriormente, se determinó finalmente la secuencia de aminoácidos de K 582 M-B como arginina- γ -hidroxiarginina-ornitina-treonina-ornitina- γ -hidroxiarginina-tirosina.

10 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental.



REIVINDICACIONES

5 1.- Procedimiento para preparar antibióticos de tipo péptido de cadena recta, designados por K 582 M y consisten
tes en arginina 1, treonina 1, tirosina 1, ornitina 2, hidrox
i-arginina m, lisina n como constituyentes aminoácidos, en donde
m de hidroxarginina es 1 - 2 y n de lisina es 0 - 1; caracteri
zado porque comprende cultivar aerobicamente un microorganismo
productor de K 582 M, perteneciente al género Metarhisium.

10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, ca
racterizado porque el cultivo se efectua en un medio de cultivo
líquido a una temperatura entre 20 y 37°C y a un pH de 3 a 8.

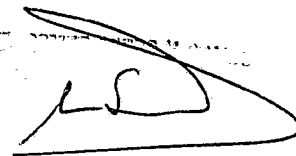
15 3.- Procedimiento para preparar antibióticos de tipo péptido de cadena recta, tal y como queda sustancialmente
descrito en la presente Memoria e ilustrado en los dibujos adjun
tos.

Esta Memoria consta de 27 hojas escritas a máqui
na por una sola cara.

Madrid, 28 JUN 1979

KAKENYAKU KAKO CO. LTD.

12 JUN 1979



m/e

FIG. 1

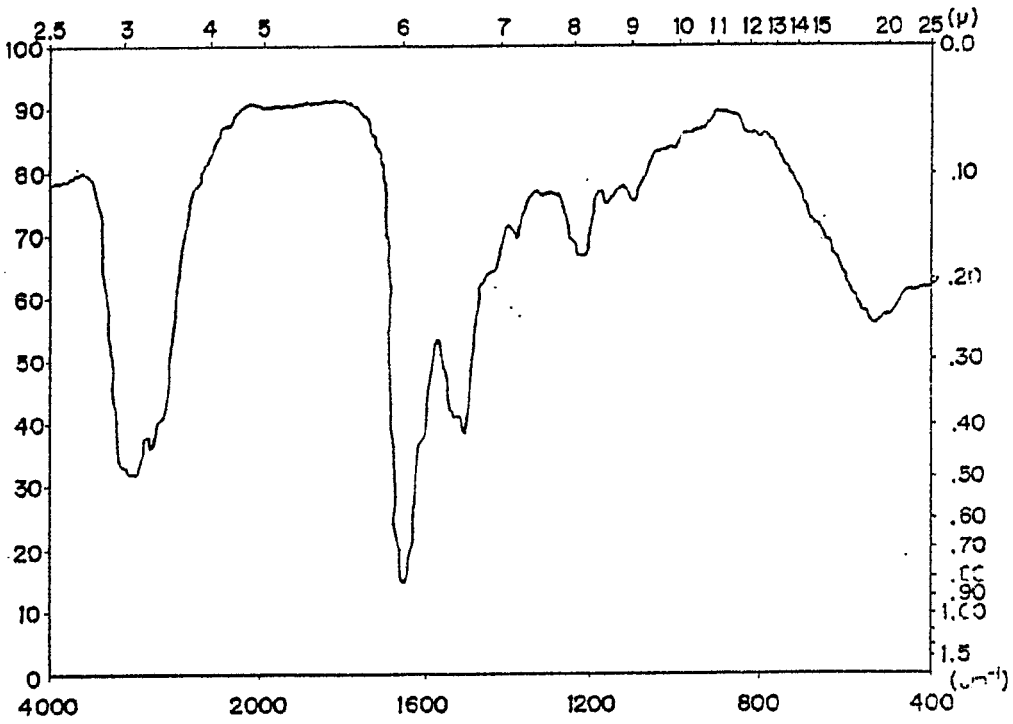
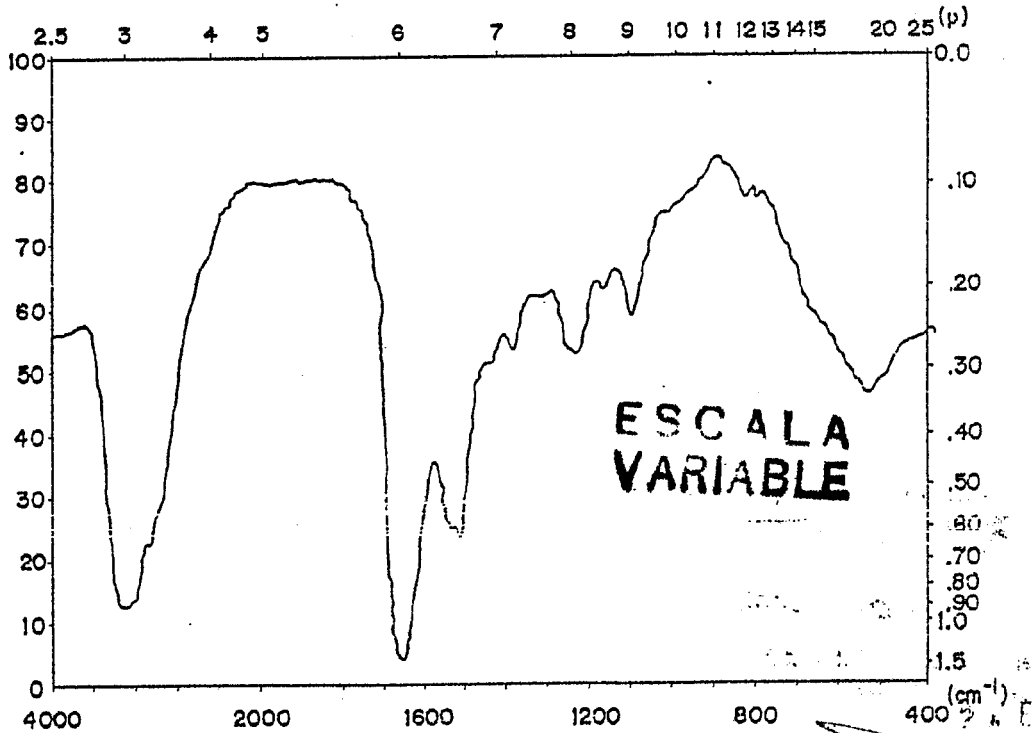
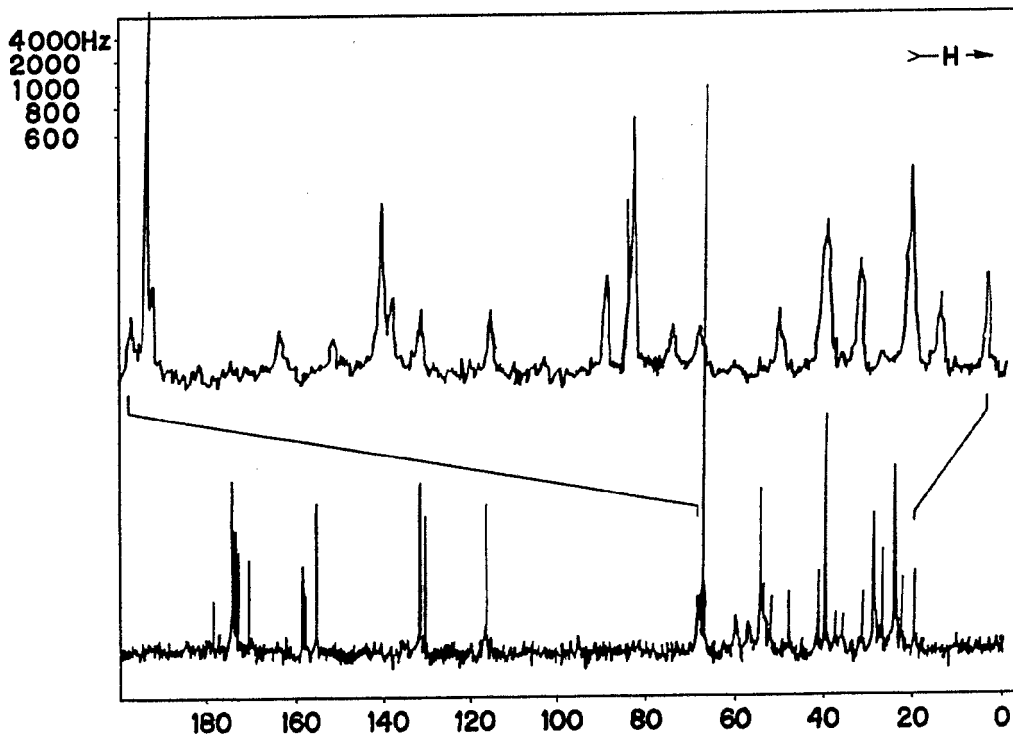


FIG. 2



Madsu
Firmador / Surveo Diox

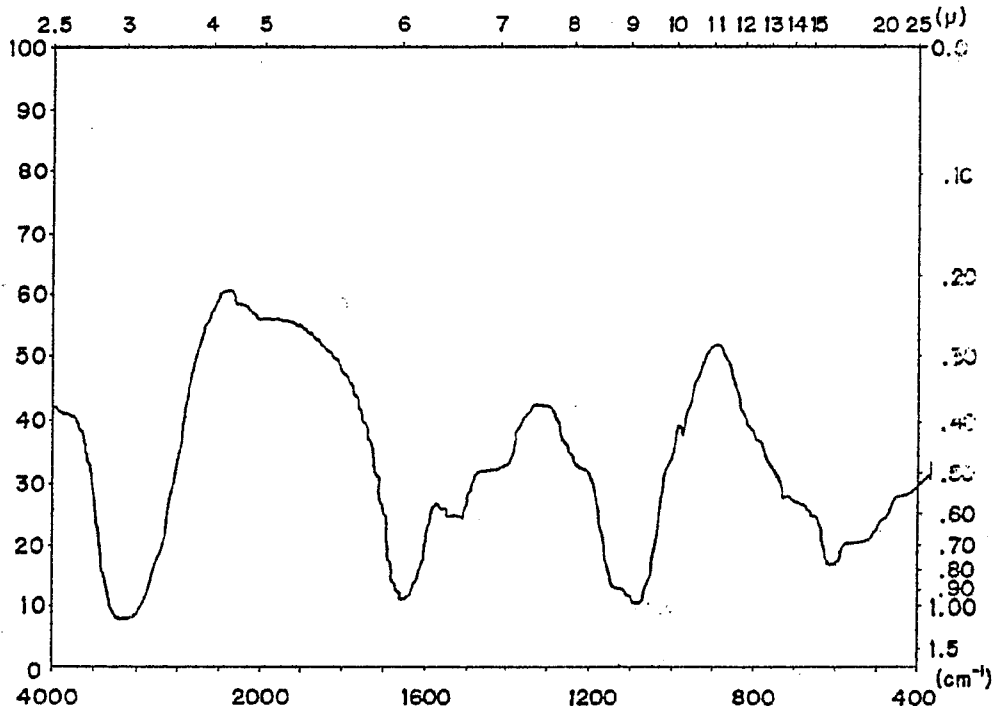
FIG. 5



ERCAL
VARIABLE

~~XXXXXXXXXX~~
[Handwritten signature]

FIG. 7



ESCALA
VARIABLE

24 ENE. 1974

[Handwritten signature]