

405471



Int. Cl.:	A61K

405471

MEMORIA DESCRIPTIVA
correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

Solicitante: MERCK & CO., INC.

Domicilio: 126 East Lincoln Avenue, RAHWAY, New Jersey, USA.

Enunciado: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN ENZIMA".

Prioridad: De la solicitud de patente estadounidense No. 170.642 del 10 de Agosto de 1.971

=====

MP.



1 Esta invención se refiere a enzimas recientemente
descubiertos útiles para reducir las placas dentales ca-
rriogénicas, a un procedimiento para el aislamiento y pu-
rificación de los enzimas y a las composiciones que con-
5 tienen los nuevos enzimas como ingrediente activo.

Es sabido que las placas dentales humanas desempe-
ñan un importante papel en el desarrollo de caries, cálcu-
los y enfermedades periodónticas, importantes problemas sa-
nitarios que deben ser evitables mediante una higiene oral
10 apropiada.

Las placas se adhieren a los dientes y a los teji-
dos gingivales y retienen su integridad, por lo menos en
parte, mediante la acción de polisacáridos y proteínas.
Uno de estos polisacáridos, un glucano, ha sido reconoci-
15 do en la técnica anterior como dextrano sometido a hidró-
lisis enzimática por las dextranasas. La incorporación de
dextranasas a los productos para la higiene bucal ha sido
propuesta en la solicitud de patente estadounidense
nº 10.983 por Woodruff y colaboradores. Análogamente, el
20 uso de proteasas dispersantes de las placas para la higie-
ne bucal ha sido propuesto por Mollé en J. Soc. Calif.
Dent. Assn., 35, 391 (1967) y por Shaver y colaboradores
en J. Periodontology, 41, 33 (1970).

25 Los solicitantes han descubierto que la placa den-
tal contiene otro glucano discreto en cantidades aproxima

405471

- 3



1 damente iguales a las del dextrano, refractario a la
acción hidrolítica de la dextranasa, para el cual se ha
propuesto el nombre de "cariogenano".

5 Ahora los solicitantes han descubierto unos enzi-
mas anteriormente no conocidos, capaces de degradar enzi-
máticamente el constituyente cariogenano de las placas
dentales. Estos enzimas han sido denominados "cariogena-
nases".

10 Debido a la capacidad de las cariogenanasas para
degradar al cariogenano, que es uno de los agentes adhe-
sivos de las placas dentales, encuentra utilidad como cons-
tituyente en los productos de higiene bucal tales como pas-
tas dentífricas, enjuagues, ungüentos para frotar o en go-
mas de mascar, pastillas, tabletas masticables, alimentos,
15 bebidas o en un chorro de agua a gran velocidad, ya sea
como único constituyente enzimático o como útil coadyuvan-
te en combinación con otros enzimas como dextranasa y/o
proteasas dispersantes de las placas.

20 Los productos para la higiene bucal deben estar
constituídos de manera que un solo tratamiento bucal expon-
ga la boca a 10-20.000 unidades de cariogenanasa y es con-
veniente de una a varias aplicaciones al día.

25 Cuando se utiliza en combinación con dextranasas,
con proteasas dispersantes de placas o con ambas, los pro-
ductos para la higiene bucal deben estar constituídos de



1 manera que un solo tratamiento bucal esponga la boca a al-
rededor de 100.000-200.000 unidades de dextranasa, alrede-
dor de 0,4-200 unidades de azocaseína de proteasa dispersan-
te de las placas y alrededor de 10 a 20.000 unidades de ca-
5 rriogenanasa, como ya se ha mencionado.

Se aislaron placas dentales humanas de varios volun-
tarios mediante rascado físico de los dientes y se encon-
tró que contenían, calculado sobre el peso seco, alrededor
de 0,6 a 2,5 % de polisacárido refractario a la dextranasa.

10 Se ha demostrado que este mismo polisacárido, junto
con dextrano, es elaborado in vitro por Streptococcus mu-
tans SL-1 (NRRL nº B-5304), cuando se cultiva en un medio
que contiene sacarosa como fuente de hidratos de carbono y
también cuando se incuba un caldo de Streptococcus mutans
15 exento de células que contiene enzimas extracelulares, em-
pleando una solución de sacarosa.

En todos los casos, el cariogenano fue separado del
dextrano acompañante mediante incubación con dextranasa. El
cariogenano fue purificado después por desproteinización
20 mediante procedimientos normales.

La estructura del cariogenano fue determinada por
procedimientos habituales que implican la hidrólisis ácida
parcial, seguido de análisis cualitativo y cuantitativo de
las fracciones de oligosacáridos producidas por la hidróli-
25 sis y por oxidación con metaperyodato y estudios de reduc-

405471



3. ción con borohidruro. De esta forma se determinó que la estructura era un glucano no ramificado con ligandos α -(1 \rightarrow 3) y α -(1 \rightarrow 2) en una proporción de 3:1 aproximadamente.

5 Los organismos microbianos capaces de hidrolizar enzimáticamente al cariogenano son aislados de las bacterias transportadas por el aire exponiendo unas placas de agar que contienen un medio nutritivo apropiado, incluido el cariogenano, como fuente de hidratos de carbono e incubando los cultivos resultantes a una temperatura adecuada, habitualmente de 28 a 37°C durante hasta unos 10 días. Los organismos que resultan activos son subcultivados en placas de agar similares con objeto de aislarlos.

10 El enzima extracelular, cariogenanasa, es producido en una cantidad aislable incubando un cultivo de un microorganismo elaborador de cariogenanasa a una temperatura adecuada, habitualmente de 28 a 37°C, en un medio nutritivo en matraces sacudidos, hasta que se produce un nivel satisfactorio de actividad de cariogenanasa, habitualmente durante 15 72 a 96 horas aproximadamente. En general, los microorganismos no necesitan el cariogenano como fuente de hidratos de carbono en el medio nutritivo para la elaboración de cariogenanasa. Uno de los organismos Bacillus sp MB-2665 (NRRL nº B-5300) utilizado para ilustrar esta invención, 20 sí que requiere cariogenano como nutriente. Sin embargo, por técnicas de mutación convencionales, puede ser produci-

25



405471

- 3

1 do un mutante constitutivo que no requiere cariogenano en el medio.

5 El enzima es aislado del caldo liberándolo de los residuos celulares y otras sustancias insolubles por centrifugación o filtración, concentrando el centrifugado de 5 a 15 veces, preferiblemente alrededor de 10 veces a vacío y precipitando la proteína por procedimientos habituales como, por ejemplo, con un disolvente orgánico, formación de complejo con metales o por saturación con una sal como sulfato amónico o similares. Es preferible utilizar precipitaciones múltiples con disoluciones intermedias del precipitado en una solución reguladora y clarificación de las soluciones resultantes por filtración o centrifugación. El precipitado final en la solución acuosa es dializado después y conservado como solución fría o en forma liofilizada.

15 El enzima así producido se caracteriza por ser específico para un ligando glucosídico α -(1 \rightarrow 3) con un ligando glucosídico vecinal α -(1 \rightarrow 2). Tiene un punto de isoelectroenfoque de 5,1. El intervalo de pH óptimo es ancho con una actividad máxima a pH 6,0. Estas características distinguen claramente la cariogenanasa de cualquier polisacarasa conocida en la técnica.

20 A continuación damos detalle de los diversos procedimientos utilizados para aislar y caracterizar el carioge-

25

405471



1 nano producido in vivo e in vitro y ejemplos para la pre-
paración y caracterización de los nuevos enzimas de este
invento, las cariogenanasas.

5 Aislamiento de cariogenano a partir de placas dentales hu-
manas

10 Se toman unas placas recientes de los donadores que
han interrumpido toda higiene bucal durante un periodo de
acumulación de placas de 4 a 6 días. Para recoger y
combinar las placas de todas las superficies dentales ase-
quibles se utiliza una pequeña espátula. La placa humede-
cida, habitualmente del tamaño de un guisante, se suspende
en unos 10 ml de agua destilada y la suspensión se coloca
en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos para inac-
15 tivar los enzimas. La sustancia insoluble se recoge por
centrifugación, se suspende de nuevo en unos 2 ml de agua
destilada y se liofiliza. Habitualmente, se obtienen de 6
a 15 mg de peso seco de placa por cada donante.

El cariogenano es aislado de la placa de la siguien-
te forma:

20 Se extraen 10 g de los polisacáridos a la tempera-
tura ambiente con 1 litro de NaOH 0,5 M, agitando constan-
tamente durante 30 minutos. La materia insoluble se separa
por centrifugación y se desprecia. El líquido que sobre-
nada ligeramente opaco se lleva a pH 5,1 por adición de
25 ácido acético 2 N, con formación de un gel denso. Se re-

405471



1 gistra el volumen de la suspensión muy viscosa y se añaden
200 unidades/ml de dextranasa. La suspensión se incuba a
37°C hasta que los azúcares que dan reacción positiva con
la antrona, solubilizados por la dextranasa, han alcanzado
5 un nivel máximo. Esto habitualmente requiere de 6 a 8 ho-
ras. El digesto de dextranasa que se ha vuelto menos visco-
so, es centrifugado para recoger los materiales no digeri-
dos. Los materiales granulados se lavan dos veces en 10 vo-
lúmenes de agua destilada. Se solubilizan en 5 volúmenes de
10 NaOH 0,5 N y se desproteinizan con un volumen igual de clo-
roformo/butanol (9:1 en volumen) en una mezcladora a peque-
ña velocidad, durante 15 minutos. El complejo de cloroformo-
proteína se elimina por separación de las fases en la
centrífuga. La capa acuosa transparente se recupera por si-
fonación y la operación de desproteización se repite has-
15 ta que el complejo de cloroformo-proteína aparece como una
piel fina que cubre parcialmente la interfase. La fase acuo-
sa transparente y casi incolora se dializa durante la no-
che frente a agua desionizada corriente. Al perder alcali-
20 nidad, el cariogenano se deposita como gel translúcido
blanco, constituido por partículas planas brillantes. El
gel es liofilizado formando un polvo brillante y esponjoso,
que representa alrededor del 25 % del peso del polisacárido
crudo de partida.

25

405471



1 Preparación de cariogenano por Streptococcus mutans in vitro

El material de partida en el aislamiento del cariogenano es producido en un medio de la siguiente composición: 5 g de extracto de levadura, 11 g de Tripticasa, 60 g de sacarosa, 1 g de Na_2CO_3 , 0,5 g de solución salina ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 800 mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 40 mg; MnCl_2 : 18 mg por cada 100 ml de agua desionizada), disueltos en 1 litro de solución reguladora de fosfato 0,1 M a pH 7,3: El medio es inoculado con Streptococcus mutans SL-1 (NRRL nº B-5304) y la materia in-
10 soluble se recoge cuando el pH ha descendido a 5,2 aproximadamente. Después de la centrifugación, el material se lava dos veces con 20 volúmenes de agua desionizada y se liofiliza.

El cariogenano es aislado de los polisacáridos crudos insolubles y liofilizados, producidos in vitro, por el procedimiento utilizado para aislar el cariogenano de las placas dentales humanas previamente descrito.

15 Preparación de cariogenano por caldo de Streptococcus mutans exento de células, in vitro

20 Los polisacáridos son producidos por adición de 5 ml de caldo de Streptococcus mutans SL-1 exento de células, recogido a pH 5,2, a 25 ml de una solución de sacarosa al 6 % en peso/volumen (en solución reguladora de fosfato 0,10 M a pH 7,0), filtración de la mezcla a través de un
25 filtro con poros de 0,45 micras e incubación a 37°C duran-

405471



1 te 7 días. Los polisacáridos se recogen por centrifugación,
se lavan dos veces en 12 ml de agua destilada, se suspenden
de nuevo en unos 2 ml de agua destilada y se liofilizan.

5 El cariogenano es aislado por la técnica anterior-
mente descrita.

Determinación de la estructura del cariogenano

(a) Espectroscopía infrarroja

10 El espectro infrarrojo del cariogenano en Nujol re-
vela un pico a 840 cm^{-1} que indica una configuración α de
los ligandos glucosídicos. La completa ausencia de absor-
ción a 890 cm^{-1} indica la falta de ligandos β -glucosídicos.

(b) Hidrólisis ácida

15 El cariogenano es hidrolizado en H_2SO_4 2 N (10 mg/ml)
durante 48 horas aproximadamente. Por neutralización con
 BaCO_3 y centrifugación se obtiene una solución transparen-
te. La cromatografía en papel y en capa fina de la solución
indica que la glucosa es el único monosacárido presente.

20 Se realizó una cromatografía en capa fina sobre pla-
cas de gel de sílice G (Analtech, Inc.) en dos sistemas.
Sistema I: n-butanol/acetona/agua, 4:5:1. Sistema II: n-bu-
tanol/ácido acético/agua/éter etílico, 9:6:1:3. Las placas
desarrolladas se dejan secar en una corriente de aire. El
butanol y el ácido acético residuales se separan colocan-
do las placas en un desecador a vacío durante 30 minutos.
25 Los azúcares son localizados pulverizando la placa desarro-

405471



1 llada con una solución al 5 % de nitrato de plata (calen-
tando a 110°C durante 10 minutos) o con un reactivo de naf-
tol-resorcinol, calentando a 100°C durante 15 minutos. Co-
mo marcadores de referencia para calcular el tamaño molecu-
5 lar de los productos de hidrólisis, resultantes de la acción
de la cariogenanasa sobre el cariogenano, se utiliza un di-
gesto de dextranasa de dextrano-100 lineal (Sigma), así como
dextrosa y rafinosa.

10 La cromatografía de papel de los productos de la hi-
drólisis enzimática y ácida se realiza sobre hojas de pa-
pel Whatman nº 1, de 20 x 55 cm aproximadamente, por el mé-
todo descendente. Los cromatogramas son desarrollados du-
rante 2 días y medio con n-butanol/piridina/agua, 6:4:3.
Los azúcares son localizados manchando con nitrato de pla-
15 ta en acetona (Trevelyan, W.E. y colaboradores, Nature, 166,
444 (1960)).

(c) Hidrólisis ácida parcial

20 El cariogenano es sometido a hidrólisis ácida tra-
tando 30 mg del mismo en 3 ml de ácido sulfúrico al 66 %,
a la temperatura ambiente, durante 15 minutos. El hidroliz-
ado es neutralizado con Ba(OH)₂ y diluido a 100 ml con
agua destilada. Después de separar el BaSO₄, el exceso de
Ba(OH)₂ se separa en forma de BaCO₃ por adición de peque-
ños trozos de hielo seco. El BaCO₃ se separa por centrfu-
25 gación. La solución transparente se concentra diez veces.



1 La cromatografía en papel y en capa fina del concen-
trado revela la presencia de nigerotriosa (O- α -D-glucopira-
nosil-(1 \rightarrow 3)-O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O- α -D-glucopirano-
sa); nigerosa (O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O- α -D-glucopira-
5 nosa); kojibiosa (O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-glucopira-
nososa) y glucosa.

No existe evidencia de isomaltosa o de isomaltotriosa (oligosacáridos ligados 1 \rightarrow 6).

(d) Oxidación con peryodato

10 Los estudios de oxidación con peryodato se realiza-
ron por un método modificado de degradación de Smith como
el descrito por Misaki y colaboradores, Agr. Biol. Chem.,
32, 432 (1968), para estudios del dextrano.

15 El contenido total en glucosa del cariogenano, de-
terminado por el ensayo de la antrona, es de 5,54 micromo-
les de anhídrido-glucosa por miligramo de polisacárido. Con-
sumió 1,53 micromoles de peryodato por miligramo (5,54 mi-
cromoles de anhidroglucosa). Una vez terminada la oxidación
con peryodato, solamente se liberaron 0,05 micromoles de
20 ácido fórmico por miligramo de peso seco.

(e) Reducción con borohidruro

25 Una suspensión de cariogenano se somete a una de-
gradación parcial de Smith. El polialdehído resultante, por
reducción con borohidruro sódico, no da un polialcohol so-
luble.

405471



- 3

1 El análisis del polialcohol para determinar la dextrosa total por el ensayo de antrona, indica 3,8 micromoles de glucosa por miligramo de polialcohol.

La hidrólisis del polialcohol no libera eritritol pero produce glicerol.

5 (f) Conclusión

Basándose en los datos obtenidos, se ha determinado que el cariogenano es un glucano lineal de ligandos α -(1 \rightarrow 3) con ligandos α -(1 \rightarrow 2) intermitentes en una proporción de 3:1 aproximadamente.

10 EJEMPLO 1

Determinación de cariogenanasa

La selección de los organismos microbianos productores de enzimas que hidrolizan cariogenano fue realizada sobre placas de agar preparadas con un medio definido que contenía cariogenano como fuente de hidratos de carbono. El medio de agar estaba constituido por los siguientes ingredientes: 100 mg de Trypticasa, 1,5 g de agar, 200 mg de cariogenano, 0,1 ml de una solución salina de la composición descrita anteriormente al tratar del medio estreptocócico; en 100 ml de solución reguladora de fosfato 0,1 M a pH 7,0. El medio fue tratado en autoclave durante 15 minutos. Con el cariogenano bien suspendido, se vierten alrededor de 10 ml del medio por cada placa Petri de 100 x 20 mm. Después de exponer a los microorganismos contenidos en el

405471



1 aire, las placas se mantienen a 28°C durante 10 días. La
producción de enzima hidrolítico es fácilmente señalada
por el aclarado del fondo del cariogenano suspendido en
agar alrededor del cultivo. Se encontraron varios organis-
5 mos activos, determinado por el grado de aclaramiento del
fondo de cariogenano suspendido en agar. Estos fueron sub-
cultivados sobre placas de agar similares con objeto de
aislarlos y se encontró que se trataba de: un hongo no iden-
tificado (MF-4490) NRRL nº 5305; Streptomyces sp (MA-4226,
10 4227, 4228 y 4229) NRRL núms. 5306, 5307, 5308 y 5309 res-
pectivamente; Bacillus sp (MB-2793, 2794, 2796 y 2665),
NRRL núms B-5301, B-5302, B-5303 y B-5300, respectivamente;
y un Corynebacterium sp (MB-2795), NRRL nº B-5310. El cul-
tivo de Bacillus, sp MB-2665, NRRL nº B-5300 fue seleccio-
15 nado como organismo para ilustrar esta invención, aunque
podría haberse empleado cualquiera de los otros.

El Bacillus sp MB-2665 fue subcultivado sobre placas
de agar conteniendo cariogenano, preparadas en la forma
descrita en el procedimiento anterior, con objeto de aislar
20 y preparar tubos L para almacenamiento.

EJEMPLO 2

Producción de cariogenanasa

La producción de cariogenanasa se realizó en matra-
ces de 2 litros sin tabiques, conteniendo 400 ml de medio
de la siguiente composición: 800 mg de caldo nutritivo,
25

405471



1 800 mg de extracto de levadura, 800 mg de Tripticasa,
0,20 ml de solución salina (igual a la citada anteriormen-
te), 8 g de cariogenano (no esencial para todos los culti-
vos) en 400 ml de solución reguladora de fosfato 0,1 M a
5 pH 7,0. Después de tratar en autoclave (15 minutos a 121°C),
el medio fue inoculado con 1 ml de un cultivo de siembra de
48 horas, criado en 50 ml (matraz agitado de 250 ml) de un
medio de dextrosa, constituido por los siguientes ingredien-
tes: Aradamine (levadura autolizada de Yeast Products, Inc.),
10 10 g; dextrosa, 10 g; KH_2PO_4 , 180 mg; Na_2HPO_4 , 190 mg;
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg, disueltos en 1 litro de agua destilada.
El cultivo de producción (MB-2665) fue incubado a 37°C en
un sacudidor a 200 rpm, con un recorrido de 2" (5 cm). El
cultivo fue colectado cuando el cariogenano suspendido se
15 había aclarado, habitualmente entre 72 y 96 horas.

EJEMPLO 3

Aislamiento de cariogenanasa

El caldo se libera de células y otra materia insolu-
ble residual por centrifugación a 2°C durante 20 minutos,
20 16.000 x g. El líquido transparente que sobrenada se concen-
tra a vacío (de 400 ml a 40 ml) y al concentrado colocado
en un baño de hielo y agitado se añade acetona a -60°C, en
porciones de 2-3 ml, hasta una concentración final del 60 %
en volumen. Las sustancias precipitadas se recogen por cen-
25 trifugación, 1500 x g, durante 10 minutos a -20°C. El preci-

405471



1 pitado es suspendido inmediatamente en 200 ml de solución
reguladora de fosfato 0,05 M a pH 7,0, enfriada con hielo.
La suspensión resultante se agita durante 60 minutos y
después se libera de las sustancias insolubles por centri-
5 fugación a 13.000 x g, durante 20 minutos a 2°C. El líquido
transparente y amarillo pálido que sobrenada se lleva
después a saturación con respecto a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El precipi-
tado se recoge por centrifugación a 13.000 x g, durante
20 minutos a 2°C. El precipitado se disuelve en 40-60 ml
10 de agua destilada enfriada con hielo y se dializa durante
24 horas. La solución transparente se liofiliza. El mate-
rial resultante (rendimiento: 150-200 mg) contiene 400-
550 unidades/mg de actividad cariogenanasa.

EJEMPLO 4

Isoelectroenfoque de cariogenanasa

15 La determinación del isoelectroenfoque fue realiza-
da sobre una columna de electroenfoque LKB de 110 ml de
capacidad, como la descrita por Chalet y colaboradores,
Applied Microbiol, 20, 421 (1970), determinándose que era
20 de 5,1.

EJEMPLO 5

Unidad actividad de cariogenanasa

La unidad actividad de cariogenanasa se basa en la
observación de que existe una relación lineal en el gráfi-
co del porcentaje de aclaramiento de una suspensión de ca-
25

405471

- 3



1 riogenano en función del logaritmo del tiempo. Con un exce-
so de substrato, la pendiente de la línea recta refleja la
actividad de enzima. Por diluciones seriadas de un prepara-
do enzimático dado, es posible construir una curva patrón,
5 representando la pendiente en función de una escala lineal
arbitraria de unidad actividad. El sistema patrón de ensa-
yo contiene 3,25 mg de cariogenano suspendido (1,0 mg/ml en
solución reguladora de fosfato 0,05 M a pH 6,0) y 0,50 ml
de enzima diluido hasta un nivel de actividad que da lugar
10 a una pendiente de 4 a 22 durante un periodo de incubación
de 5 horas. Con niveles más altos de enzima, la pendiente
es más limitativa. Las incubaciones se realizan a 37°C en
cubetas tapadas colocadas sobre un incubador rotatorio, las
lecturas de la densidad óptica se realizan a 620 mμ a los
15 tiempos 0, 1, 3 y 5 horas. En un sistema de ensayo no lineal,
por ejemplo, una pendiente de 5 es igual a 6 unidades/ml,
una pendiente de 10 es igual a 16 unidades/ml y una de 20
es igual a 62 unidades/ml.

EJEMPLO 6

20 pH Optimo para la actividad de la ca-
riogenanasa

25 El pH óptimo para la cariogenanasa es determinado
en las condiciones de ensayo habituales, observando el por-
centaje de dispersión de las suspensiones de cariogenano
apropiadamente reguladas (regulador 0,1 M de Sorensen) en
un intervalo de pH comprendido entre 4,9 y 8,0. El porcen-

405471

- 3



1 to en ligandos α -(1 \rightarrow 2), según la especificidad del enzima.
Se ha determinado que la susceptibilidad al peryodato de la
estructura interna (4,42 unidades de glucosa) aumenta des-
de alrededor del 25 % hasta el 45 %. La deducción de estos
5 hallazgos indica que el ligando α -(1 \rightarrow 2) permanece intacto
y que el ligando α -(1 \rightarrow 3) es atacado por el enzima. Además,
se ha observado que son hidrolizados por el enzima aproxi-
madamente tantos ligandos α -(1 \rightarrow 3) como ligandos totales
 α -(1 \rightarrow 2) en el glucano. Se especula que el ligando α -(1 \rightarrow 2)
10 desempeña un cierto papel en la especificidad del enzima en
el sentido de reconocimiento del centro de ataque de un li-
gando α -(1 \rightarrow 3), ya que los disacáridos, kojibiosa y nigerosa,
son productos de la hidrólisis ácida y la nigerotriosa
es un producto final de la hidrólisis enzimática y la ni-
15 gerosa así como el nigerano, no son substratos para la ca-
riogenanasa.

EJEMPLO 8

Pasta o polvo dentífricos

20 Los preparados aceptados del tipo encontrado en los
libros de texto o en el mercado son suplementados con
5-10.000 unidades de enzima cariogenanasa por gramo de pre-
parado. Este debe ser utilizado en la forma habitual sobre
un cepillo de dientes, utilizando en cada tratamiento alre-
dedor de 2 g de la pasta dentífrica.

25

405471

-3-



1

EJEMPLO 9

Ungüento o loción para frotamiento

5

Los preparados aceptados del tipo que se encuentra en los libros de texto o en el mercado son suplementados con alrededor de 10-20.000 unidades de enzima cariogenanasa por gramo de preparado. Este debe ser aplicado a los dientes y encías, por ejemplo con los dedos.

EJEMPLO 10

Enjuague bucal

10

Los preparados aceptados del tipo que se encuentra en los libros de texto o en el mercado son suplementados con unas concentraciones de cariogenanasa del orden de 1,0-2000 unidades por mililitro de preparado. Este debe ser agitado en la boca en la forma habitual, calculando que el volumen medio empleado es de 20-40 ml.

15

EJEMPLO 11

Goma de mascar

20

Los preparados aceptados del tipo que se encuentra en los libros de texto o en el mercado son suplementados con 2,5-5000 unidades de enzima cariogenanasa por gramo del preparado, ya que una barra de goma de mascar corriente pesa alrededor de 4 g. Por ejemplo, la barra de goma de mascar debe ser masticada en la forma habitual. De forma similar, puede emplearse una tableta masticable.

25

405471



1972

1

EJEMPLO 12

Pastilla

Los preparados aceptados del tipo que se encuentra en los libros de texto o en el mercado son suplementados con 10-20.000 unidades de cariogenanasa por pastilla. Esta última debe ser disuelta lentamente en la boca en la forma habitual. Este es el tipo preferido de preparado ya que su forma habitual de uso proporciona el tiempo de contacto más prolongado entre el enzima activo y la placa.

5

10

EJEMPLO 13

Alimento

Como generalmente se consumen grandes cantidades de alimentos, deben añadirse alrededor de 1-2000 unidades de enzima cariogenanasa a 1 gramo del alimento, tales como cereales para el desayuno y panes, por ejemplo.

15

Otros ejemplos de especial valor son la adición del enzima a alimentos que contienen grandes cantidades de sacarosa, tales como los dulces y helados normales. La masticación en la forma habitual produce la aplicación del enzima a los dientes y encías.

20

EJEMPLO 14

Bebidas

El enzima puede ser agregado al agua de beber o a la leche, pero es especialmente valioso en las bebidas que contienen sacarosa como cola, naranjada y bebidas saboriza-

25



1 das similares, que contienen sacarosa y/o edulcorantes ar-
 2 tificiales. Debe agregarse en la proporción de alrededor
 3 de 1 a 2000 unidades del enzima cariogenanasa por mililitro
 4 de una bebida de cola convencional. En el acto de beber, el
 5 preparado es aplicado a las encías y dientes.

EJEMPLO 15

Chorro limpiador de los dientes

Al agua utilizada en el aparato convencional para di-
 10 rigir un chorro de agua a gran velocidad sobre los dientes
 para limpiarlos, se añade cariogenanasa en la proporción de
 10-20.000 unidades por mililitro de solución.

En la Tabla I se encuentran otros preparados que con-
 tienen cariogenanasa y dextranasa o proteasa o ambas.

TABLA I

15	<u>Preparado</u>	<u>Cariogenanasa</u>	<u>Dextranasa</u>	<u>Proteasa</u>
	Pasta o polvo dentífricos	5-10.000*	100-200.000	
		5-10.000		0,2-100
		5-10.000	100-200.000	0,2-100
20	Ungüento o lo- ción para fro- tamientos	10-20.000	100-200.000	
		10-20.000		0,2-100
		10-20.000	100-200.000	0,2-100
	Enjuague bucal	1-2000	100-50.000	
		1-2000		0,2-100
25		1-2000	100-50.000	0,2-100

405471



1

TABLA I (continuación)

<u>Preparado</u>	<u>Cariogenanasa</u>	<u>Dextranasa</u>	<u>Proteasa</u>
Goma de mascar	2,5-5000	100-50.000	
	2,5-5000		0,2-100
5 Alimentos	2,5-5000	100-50.000	0,2-100
	1-2000	10-50.000	
	1-2000		0,2-100
	1-2000	10-50.000	0,2-100
10 Bebidas	1-2000	10-50.000	
	1-2000		0,2-100
	1-2000	10-50.000	0,2-100
Chorro limpiador	10-20.000	10-50.000	
	10-20.000		0,2-100
15	10-20.000	10-50.000	0,2-100
Pastillas	10-20.000 unidades/pastilla	100-200.000	
	10-20.000 unidades/pastilla		0,2-100
	10-20.000 unidades/pastilla	100-200.000	0,2-100

20

* Unidades por mililitro de líquido o por gramo de sólido, salvo indicación en contrario.

25



1

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

- REIVINDICACIONES -

5

1. Un procedimiento para la preparación de un enzima capaz de degradar al cariogenano, que consiste en:

- 10
- (a) exponer a los microorganismos un medio nutritivo semi-sólido que contiene cariogenano como fuente de hidratos de carbono;
 - (b) incubar los cultivos resultantes hasta que se observa cierto aclaramiento del cariogenano suspendido;
 - (c) aislar un microorganismo activo;
 - (d) cultivar el microorganismo aislado en un medio nutritivo adecuado;
 - 15 (e) separar las materias insolubles del caldo y
 - (f) aislar la proteína del caldo clarificado.

15

20

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el microorganismo aislado es un hongo, NRRL nº 5305; un Streptomyces sp, NRRL nº 5306; un Streptomyces sp, NRRL nº 5307; un Streptomyces sp, NRRL nº 5.308; un Streptomyces sp, NRRL nº 5309; un Bacillus sp, NRRL nº B-5300; un Bacillus sp, NRRL nº B-5301; un Bacillus sp, NRRL nº B-5302; un Bacillus sp, NRRL nº B-5303 o un Corynebacterium sp, NRRL nº B-5310.

25

405471

-3



- 1 3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en
el que el microorganismo aislado es un Bacillus sp, NRRL
nº B-5300.
- 5 4. Un procedimiento para la preparación de un enzi-
ma capaz de degradar al cariogenano, que consiste en:
- (a) exponer a los microorganismos un medio nutritivo que
contiene cariogenano como fuente de hidratos de carbono;
- (b) incubar los cultivos resultantes hasta que se observa
cierto aclaramiento del cariogenano suspendido;
- 10 (c) aislar un microorganismo activo;
- (d) cultivar el microorganismo aislado en un medio nutri-
tivo adecuado;
- (e) separar las materias insolubles del caldo;
- (f) concentrar la solución transparente;
- 15 (g) precipitar por adición de acetona;
- (h) suspender el precipitado en una solución reguladora y
separar las materias insolubles;
- (i) precipitar con sulfato amónico y
- (j) dializar el precipitado.
- 20 5. Un procedimiento según la Reivindicación 4, en
el que el microorganismo aislado es un hongo, NRRL nº 5305;
un Streptomyces sp, NRRL nº 5306; un Streptomyces sp, NRRL
nº 5307; un Streptomyces sp, NRRL nº 5308; un Streptomyces
sp, NRRL nº 5309; un Bacillus sp, NRRL nº B-5300; un
25 Bacillus sp, NRRL nº B-5301; un Bacillus sp, NRRL nº B-5302;

405471 - 3



1 un Bacillus sp, NRRL nº B-5303 o un Corynebacterium sp,
NRRL nº B-5310.

5 6. Un procedimiento según la Reivindicación 4, en
el que el microorganismo aislado es un Bacillus sp, NRRL
nº B-5300.

7. Un procedimiento según la Reivindicación 4, en
el que la concentración de la etapa (f) es una concentra-
ción de diez veces.

10 8. Un procedimiento según la Reivindicación 4, en
el que la precipitación con acetona consiste en añadir ace-
tona a -60°C hasta una concentración final del 60 %.

9. Un procedimiento según la Reivindicación 5, en
el que la concentración de la etapa (f) es una concentra-
ción de diez veces.

15 10. Un procedimiento según la Reivindicación 5, en
el que la precipitación con acetona consiste en añadir ace-
tona a -60°C hasta una concentración final del 60 %.

20 11. Un procedimiento según la Reivindicación 6, en
el que la concentración de la etapa (f) es una concentra-
ción de diez veces.

12. Un procedimiento según la Reivindicación 6, en
el que la precipitación con acetona consiste en añadir ace-
tona a -60°C hasta una concentración final del 60 %.

25 13. Un procedimiento para la preparación de un en-
zima capaz de degradar al cariogenano, que consiste en:

M

405471



1972

- 1 (a) cultivar Bacillus sp, NRRL nº B-5300 en un medio nutritivo adecuado que contiene cariogenano como única fuente de hidratos de carbono, hasta que se ha consumido el cariogenano disponible;
- 5 (b) separar las materias insolubles del caldo;
- (c) concentrar la solución transparente alrededor de diez veces;
- (d) añadir acetona a unos -60°C hasta una concentración final del 60 % aproximadamente;
- 10 (e) disolver el precipitado en una solución reguladora de fosfato a pH 7 aproximadamente y separar las materias insolubles;
- (f) añadir sulfato amónico hasta la saturación y
- (g) dializar el precipitado.

15 14. Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN ENZIMA.

20 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva, que consta de veintisiete páginas mecanografiadas.

Madrid, 3 de Agosto de 1.972

BERNARDO UNGRIA

D.P.

25