

27 FEB



412097

PATENTE DE INVENCION

Ref: Le A 14 202-Sp.

412097

Memoria Descriptiva

sobre:

Procedimiento para la producción de inhibidores de sacarasa.

F.C. 10-4-75

Int. Cl.:	CORB
-----------	------

Solicitante: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, entidad alemana, residente en Leverkusen-Bayerwerk, República Federal Alemana.

=====

Constituye el objeto de solicitudes de patente, anteriores (por ejemplo la solicitud de patente alemana P 20 64 092.0) el conocimiento de que una serie de actinomicas, sobre todo las actinoplanáceas, forman inhibidores para hidrolasas de glucósidos, preferiblemen

5.



te enzimas desdobladoras de hidratos de carbono del aparato digestivo. Un grupo de estos inhibidores es relativamente estable al calor y a la temperatura ambiente es resistente a ácidos y álcalis. Estos inhibidores pertenecen químicamente a la clase de los oligo- y polisacáridos, respectivamente sus derivados.

La mayoría de los inhibidores de este grupo son inhibidores de amilasa altamente potentes, pero son inhibidores de sacarasa tan solo medio fuertes o débiles.

Constituye ahora el objeto de la invención un procedimiento para la transformación de los mencionados inhibidores de amilasa en potentes inhibidores de sacarasa. El mismo consiste en que se descomponen los inhibidores de amilasa enzimática o químicamente.

Ensayo de amilasa.

Una unidad de inhibidor de amilasa (1 UIA) se define como aquella cantidad de inhibidor capaz de inhibir dos unidades de amilasa al 50 %. Una unidad de amilasa (UA) es aquella cantidad de enzima que en un minuto bajo las condiciones de ensayo abajo indicadas, desdobra 1 μ equivalente de ligaduras glucosídicas en el almidón. Los μ equivalentes (μ Val) de ligaduras desdobladas son determinados colorimétricamente con ácido dinitrosalicílico como μ Val de azúcares reductores formados y son indicados mediante una curva de graduación de maltosa como μ Val equivalentes de maltosa. Para la realización del ensayo, se mezcla 0,1 ml de solución de amilasa (20 a 22 UA/ml) con 0 a 10 μ g de inhibidor o 0 a 20 μ l de la solución a ensayar en 0,4 ml de glicerofosfato de sodio tampón 0,02-molar/ CaCl_2 0,001-molar, pH = 6,9, y se la equilibra durante unos 10 a 20 minutos en un baño de agua de



- 35°C. Entonces se hace la incubación con 0,5 ml de una solución de almidón al 1 % precalentada a 35°C (almidón soluble de la casa Merck, Darmstadt, No. 1252) a 35°C y subsiguientemente se mezcla con 1 ml de reactivo de ácido dinitrosalicílico (según P. Bernfeld en Colowick-Kaplan, Meth. Enzymol., Tomo 1, Página 149). Para el desarrollo de color, la preparación es calentada durante 5 minutos sobre el baño de María en ebullición, entonces es enfriada y mezclada con 10 ml de agua destilada. La extinción a 540 nm es medida en relación a un valor en blanco correspondientemente fijado, sin amilasa. Para la evaluación, de una curva de graduación de amilasa previamente tomada se lee la actividad de amilasa todavía eficaz después de la adición de inhibidor, y de ella se calcula la inhibición porcentual de la amilasa aplicada. La inhibición porcentual es marcada como función del cociente.

$$\frac{\mu\text{g inhibidor} +}{\text{UA} ++}$$

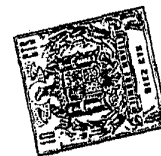
UA ++

+ calculado sobre sustancia seca,

++ UA en la preparación no inhibida de la misma serie, el punto de inhibición al 50 % se lee de la curva y se lo calcula en UIA/mg de inhibidor.

20. Ensayo de sacarasa.

- Una unidad de inhibidor de sacarasa (UIS) se define como aquella cantidad de inhibidor capaz de inhibir dos unidades de sacarasa al 50 %. Una unidad de sacarasa (US) es aquella cantidad de enzima que en un minuto bajo las condiciones de ensayo abajo indicadas desdobra 1 μmol de sacarosa en glucosa y fructosa. El μmol de glucosa formada es determinado cuantitativamente, con ayuda de la reacción de oxidasa de glu.



- cosa, bajo condiciones a las cuales deja de producirse un desdoblamiento ulterior de sacarosa por la sacarasa. Para la realización del ensayo, se mezclan 0,05 ml de una solución de sacarasa ajustada a 0,12 US, con 0 a 20 μ g de inhibidor o 0 a 20 μ l de la solución a ensayar y se completa la mezcla a 0,1 ml con maleinato de sodio tampón 0,1-molar, pH = 6,0. Se equilibra durante 10 minutos a 35°C y entonces se mezcla con 0,1 ml de una solución de sacarosa 0,05-molar precalentada a 35°C en maleinato de sodio tampón 0,1-molar, pH = 6,0. Se hace la incubación durante 20 minutos a 35°C y se para la reacción de sacarasa por adición de 1 ml de reactivo de oxidasa de glucosa 2) y se continúa la incubación durante otros 30 minutos a 35°C. Subsiguientemente se agrega 1 ml de H₂SO₄ al 50 % y se mide a 545 nm en relación a un valor en blanco correspondiente.

- 1) Sacarasa solubilizada obtenida de la mucosa del intestino delgado de cerdos, según B.Borgström, A.Dahlquist, Acta Chem. Scand. 12 (1958), página 1997. Diluida con maleinato de sodio tampón 0,1-molar, pH = 6,0, hasta el correspondiente contenido de US.
- 2) El reactivo de oxidasa de glucosa es preparado por disolución de 2 mg de oxidasa de glucosa (Casa Boehringer No. 15423 EGAB) en 100 ml de tris-HCl tampón 0,565-molar, pH= 7,0 y por subsiguiente adición de 1 ml de una solución de detergente (2 g de Triton X 100 + 8 g de etanol al 95 % p.a.), 1 ml de solución de dianisidina (260 mg de o-dianisidina . 2HCl en 20 ml de H₂O) y 0,5 ml de una solución acuosa a 0,1 % de peroxidasa (Casa Boehringer No. 15302 EPAP).



Para la evaluación se calcula la inhibición porcentual de la sacarasa aplicada y del punto de inhibición al 50 % se la calcula, con ayuda de una curva de graduación, en UIS/g, respectivamente en UIS/litro.

5. La transformación de los inhibidores de amilasa en inhibidores de sacarasa procede por desdoblamiento de fragmentos de molécula inactivos como inhibidores (en la mayoría de los casos, mono-, di- o trisacáridos) de las moléculas de inhibidor. Este desdoblamiento de fragmentos de molécula inactivos como inhibidores, procede por desdoblamiento enzimáticamente hidrolítico o por desdoblamiento químicamente hidrolítico; de preferencia, uno se sirve de la hidrólisis de ácido a altas temperaturas. A tal efecto se hidrolizan soluciones al 1-40 %, preferiblemente al 2-20 % de los precitados inhibidores de amilasa altamente potentes en ácidos minerales 0,1 a 5-normales, preferiblemente 0,5 a 2-normales, de preferencia, HCl o H₂SO₄, durante 0,1 a 6 horas, preferiblemente 0,5 a 4 horas, a 60-110°C, preferiblemente a 80-100°C, observándose, a medida que aumenta la duración de la hidrólisis, una caída brusca de la actividad inhibidora de amilasa de las soluciones a un aumento brusco simultáneo y una subsiguiente caída lenta de la actividad inhibidora de sacarasa de las soluciones. El cociente $f = \frac{UIS}{UIA} \times 10^3$, a medida que aumenta la duración de la hidrólisis, sube en forma correspondientemente empinada [Compárese Fig.1. Esta figura demuestra el desarrollo temporal del contenido de inhibidor de amilasa (1) y del contenido de inhibidor de sacarasa (2), así como el cociente f (3) de una solución al 2 % del inhibidor de amilasa de la cepa SE 50 en la hidrólisis en HCl 0,5-normal a 100°C durante 0 a 100 minutos. Sobre el eje x se indica el

412097-6-



tiempo en minutos, sobre el eje y_1 se indican las UIA $\times 10^6$ /litro, sobre el eje y_2 las UIS $\times 10^3$ /litro y sobre el eje y_3 se indica el cociente f . Elevadas concentraciones de ácido,

5.

concentraciones bajas del inhibidor en la solución y temperaturas altas producen un aumento particularmente fuerte del valor f , vale decir, un desplazamiento particularmente notable de la relación de inhibición de sacarasa/amilasa hacia la sacarasa [Compárese las Figuras 2 y 3. Estas figuras

10.

demuestran el desarrollo temporal de la relación de inhibición de sacarasa/amilasa en relación al tiempo de hidrólisis bajo diferentes condiciones de hidrólisis. En las dos Figuras, el eje x representa el tiempo en minutos, el eje y el cociente f .

15.

La Figura 2 demuestra el desarrollo de la hidrólisis a 100°C ,

Curva 1 HCl 1-normal 20 mg/ml

Curva 2 HCl 1-normal 200 mg/ml

Curva 3 HCl 0,75-normal 20 mg/ml

Curva 4 HCl 0,75-normal 200 mg/ml

20.

Curva 5 HCl 0,5-normal 20 mg/ml

Curva 6 HCl 0,5-normal 200 mg/ml.

25.

La Figura 3 demuestra la influencia de la concentración de ácido y de la temperatura sobre la relación de UIS/UIA. C = 20 mg de inhibidor de amilasa de la cepa SE 50/ml, ácido HCl

Curva 1 2-normal 90°C

Curva 2 2-normal 80°C

Curva 3 1-normal 90°C

Curva 4 1-normal 80°C

30.

Curva 5 0,5-normal 90°C



Curva 6 2-normal 70°C \pm 0,5 80°C

Curva 7 2-normal 60°C

Curva 8 1-normal 70°C.

5. El aislamiento del principio inhibidor de sacarasa de tales hidrolizados es efectuado ópticamente por adsorción sobre carbón activo previa neutralización del hidrolizado y sub-
siguiente desadsorción fraccionante del inhibidor desde el carbón con alcoholes acuosos o acetona acuosa. Si los hidrolizados llegan a tener un color muy oscuro, los mismos son
10. descolorados con carbón activo a valores pH ácidos (pH 1 - 3), antes de la adsorción del inhibidor de sacarasa sobre el carbón.

La capacidad inhibidora de los mejores preparados de inhibidor asciende a 15 000 UIS/g.

15. La descomposición según el invento puede proceder también enzimáticamente, para lo cual se presta particularmente bien la β -amilasa.

20. Es conocido que en animales y en seres humanos, después de comer alimentos y productos deleitosos que contienen sacarosa, ocurren hiperglucemias provocadas a causa de un desdoblamiento rápido de la sacarosa por sacarasas del aparato digestivo según el siguiente esquema



25. Estas hiperglucemias son pronunciadas en forma particularmente fuerte y duradera en el caso de diabéticos. En adiposos, la hiperglucemia alimenticia a menudo provoca una secreción particularmente fuerte de insulina que a su vez conduce a una aposición aumentada de grasa y a una reducida descomposición de grasa.



Los inhibidores de sacarasa obtenidos y aislados de acuerdo con la invención y según los métodos arriba indicados, disminuyen considerablemente la hiperglucemia alimenticia y la hiperinsulinemia en ratas después de la administración de sacarosa.

5.

Además, es conocido que, después de comer alimentos y productos deleitosos conteniendo sacarosa, la caries ocurre en forma particularmente fuerte y frecuente [por ejemplo W. Gold: Advances in Applied Microbiology 11 (1969) 135 - 157]

10.

Una inhibición del desdoblamiento de sacarosa por el inhibidor producido según la invención, reduce la formación de sustancias cariogénas en la cavidad bucal.

Estos inhibidores de sacarasa, por ello, son aptos como productos terapéuticos para las siguientes indicaciones:

15.

Adipositas, hiperlipemia (aterosclerosis), diabetes, prediabetes, caries.

Dosificación: 100 a 10 000 UIS una o varias veces por día antes y/o durante y/o después de las comidas por vía bucal.

20.

Formas de preparación: Pastillas, gráneas, cápsulas, soluciones, suspensiones, granulados, goma de mascar, pasta dentífrica y como aditivos a productos alimenticios y deleitosos.

Ejemplo 1

25.

5 g del inhibidor de amilasa de la cepa de actinoplanáceas SE 50 (CBS - No. 961.70) con 10×10^6 UIA/g y 220 UIS/g fueron disueltos en 50 ml de acetato de sodio tampón, 0,05-molar, pH = 4,5 y mezclados con 25 mg de β -amilasa de cebada y sometidos a la incubación a 35°C. La preparación de incubación

30.

fué insilada bajo agitación directamente en 450 ml de al-



cohol seco, el precipitado coposo blanco fué recogido por filtración a succión, lavado dos veces con etanol y con éter y secado en vacío.

Rendimiento: 2,5 g con $4,6 \times 10^6$ UIA/g y 700 UIS/g.

5.

Ejemplo 2

100 g del inhibidor de amilasa de la cepa SE 50 fueron disueltos en 500 ml de H_2SO_4 2-normal e hidrolizados durante 4 horas a $100^\circ C$. La solución de color pardo negruzco, después del enfriamiento, fué ajustada con KOH 10-normal al valor pH de 2 y para su descoloramiento fué mezclada dos veces cada vez con 4 g de carbón activo y fué agitada cada vez durante unos 10 minutos y entonces fué filtrada a succión. Se desechó el carbón, se neutralizó el filtrado de color amarillo claro con KOH 10-normal (pH = 6,6). Se mezcló el filtrado con 20 g de carbón activo para la adsorción sobre el carbón de los fragmentos activos como inhibidores. Después de una agitación durante 10 minutos, se filtró a succión y nuevamente se sometió el filtrado a una adsorción con 10 g de carbón activo. Los residuos de carbón fueron reunidos y el filtrado fué desechado. Para la eliminación de sales restantes y de glucosa, los residuos de carbón reunidos fueron lavados con 2 litros de agua destilada y 2 litros de etanol al 2,5 % sobre el filtro a succión y subsiguientemente fueron desadsorbidos tres veces cada vez con 750 ml de etanol al 10% y entonces con etanol al 15 %. Para la desadsorción se agitó cada vez durante 10 minutos, entonces se filtró a succión y se mezclaron los residuos de carbón con nuevo agente de desadsorción. Los correspondientes filtrados de la desadsorción al 10 %, respectivamente al 15 %, fueron reunidos y concentrados en el evaporador giratorio hasta aproximadamente 20 ml.

- 10412097



y subsiguientemente el residuo fué liofilizado. Rendimiento: aproximadamente 2 g de la fracción al 10 % y 1,2 g de la fracción al 15 %.

Actividad específica = Fracción al 10 % 9000 UIS/g; $0,2 \times 10^6$ UIA/g

Fracción al 15 % 15000 UIS/g; $0,5 \times 10^6$ UIA/g

Ejemplo 3

200 mg de un inhibidor de amilasa (6×10^6 UIA/g, 160 UIS/g) aislado de la cepa de actinoplanáceas SE 82 (CBS-No. 615.71), fueron disueltos en 10 ml de HCl 0,75-normal. La solución de partida tenía una actividad de 120×10^6 UIA/litro a 3200 UIS/litro. Esta solución fué sometida a la incubación durante 30 minutos a 100°C en el baño de agua, entonces fué enfriada y ensayada. El contenido de inhibidor de amilasa en el hidrolizado así obtenido ascendió a 8×10^6 UIA/litro y el contenido de inhibidor de sacarasa ascendió a 21000 UIS/litro.

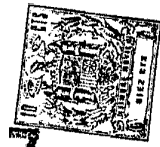
Ejemplo 4

200 mg de un inhibidor de amilasa (4×10^6 UIA/g, 310 UIS/g) aislado de la cepa de actinoplanáceas SB 18 (CBS - No. 957.70), fueron disueltos en 10 ml de HCl 0,75-normal. La solución de partida tenía una actividad de 80×10^6 UIA/litro y de 6200 UIS/litro. Se sometió esta solución a la incubación durante 30 minutos a 100°C en el baño de agua, entonces se la enfrió y se la ensayó. El contenido de inhibidor de amilasa en el hidrolizado así obtenido, ascendió a 10×10^6 UIA/litro y de inhibidor de sacarasa a 28 000 UIS/litro.

Ejemplo 5

Método de ensayo para la comprobación del efecto de la sustancia activa del Ejemplo 2 en ratas en el ensayo de admi-

412097



nistración de sacarosa.

5. Para la provocación de una hiperglucemia y de una hiperinsulinemia, después de la administración de hidrato de carbono, unas ratas (n = 6) reciben 2,5 g/kg de sacarosa como solución por vía bucal. A igual número de ratas se administra oralmente, en adición a la sacarosa, la citada sustancia activa para debilitar la hiperglucemia e hiperinsulinemia. La glucosa en la sangre y la insulina en el suero son determinadas a los intervalos de tiempo indicados a contar de la administración de hidrato de carbono. La determinación de hidratos de carbono reductores procede con el analizador automático [Technicon®], según Hoffman: J.Biol.Chem. 120, 51 (1937)] y la determinación de la insulina según Haler y Randle [Biochem. J. 88, 137 (1963)]. Se saca la sangre del plexus venoso retroorbital.
- 10.
- 15.

Tabla 1 para el Ejemplo 5

Glucosa en la sangre en % en mg. (valor medio \pm 1 s) e insulina en el suero en μ unidades/ml (valor medio \pm 1 s) de ratas en ayunas a distintos tiempos a contar de la administración oral de sacarosa \pm sustancia activa del Ejemplo 2.

Dosis/kg per os	glucosa en la sangre		insulina en el suero	
	10	20 minutos	10	20 minutos
Testigo sin saca rosa	79 \pm 5,9	79 \pm 4,8	17 \pm 11,0	9 \pm 7,3
testigo con saca rosa	142 \pm 20	148 \pm 17	31 \pm 14,2	39 \pm 13,2
sacarosa + 100 UIS	95 \pm 5,3 =====	94 \pm 6,3 =====	8 \pm 5,7 -----	7 \pm 2,8 =====
sacarosa + 1000 UIS	83 \pm 5,2 =====	85 \pm 7,6 =====	11 \pm 6,0 -----	8 \pm 5,4 =====

412097
- 12 -



==== P < 0,001 en relación al testigo con sacarosa

—— P < 0,001 en relación al testigo con sacarosa

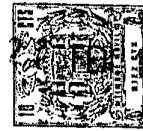
---- P < 0,05 en relación al testigo con sacarosa

- N O T A -

5. Descripta 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. También se hace constar que el
10. invento corresponde a una Solicitud de Patente, presentada en Alemania, con fecha 1 de marzo de 1972, bajo el número P 22 09 832.4, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los convenios internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre:
15. **PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE INHIBIDORES DE SACARASA;** caracterizándose por lo siguiente:
20. 1ª.- Procedimiento para la producción de inhibidores de sacarasa, caracterizado porque comprende descomponer inhibidores de amilasa de la clase de oligo- y polisacáridos y sus derivados, a inhibidores de sacarasa.
25. 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se descomponen inhibidores de amilasa de las cepas de actinoplanáceas SE 50, SE 82, SB 18.
30. 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la descomposición se efectúa con ácidos acuosos a temperatura elevada.
- 4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la descomposición se efectúa enzimáticamente.
- 5ª.- Procedimiento para la producción de inhibidores

412097

- 13 -



1973

de sacarasa, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en los adjuntos dibujos.

Esta Memoria consta de 13 hojas, escritas a máquina por una sola cara.

5.

Madrid 27 FEB. 1973

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

I. GOMEZ ACEBO Y MODET

p. p. Firmados L. Gaeta Ferrández

A handwritten signature in cursive script, likely belonging to L. Gaeta Ferrández.

A small, circular handwritten mark or signature in the bottom left corner.

412097

27

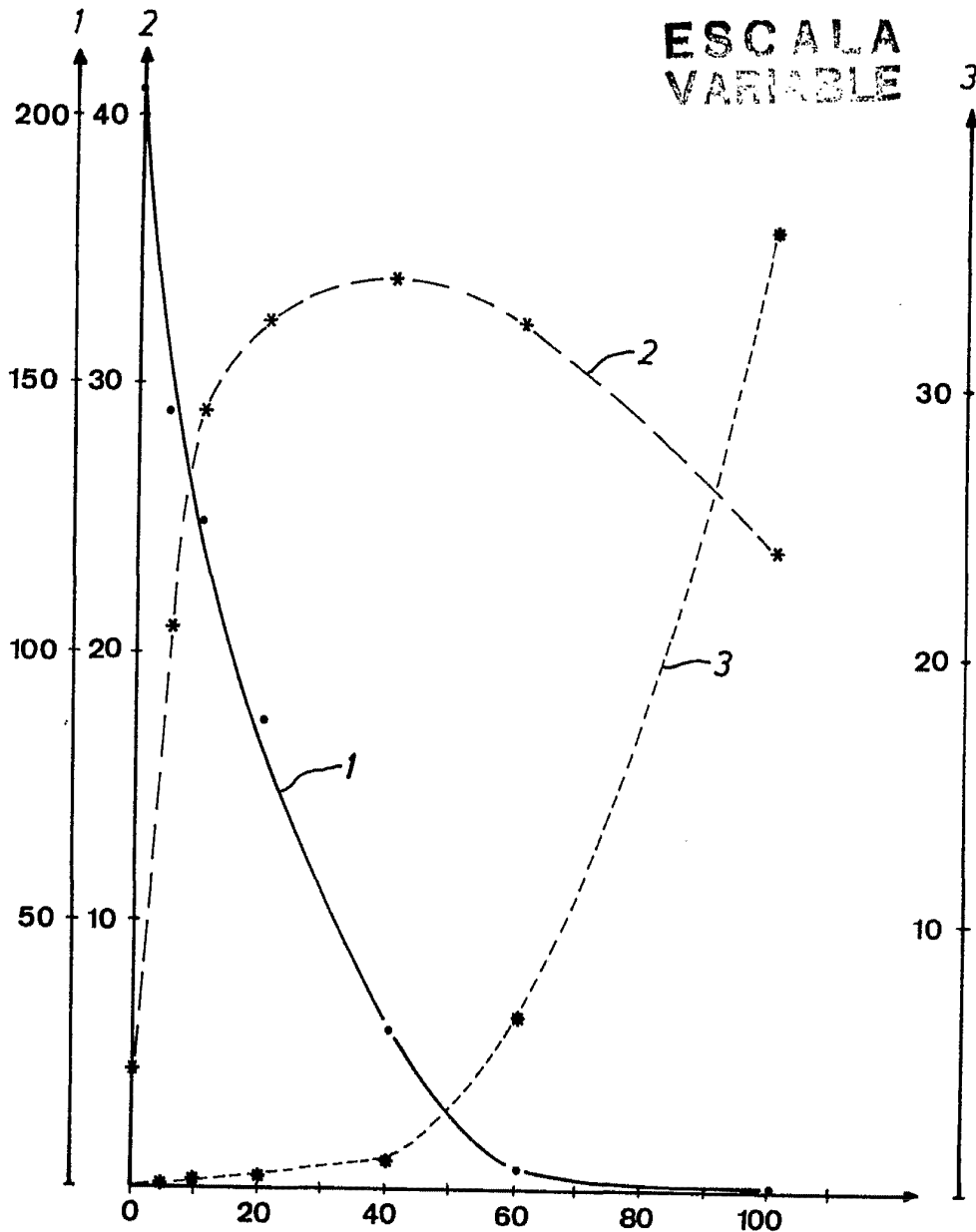


FIG. 1

27 FEB. 1973

Md. 1973

J. GOMEZ ACEBO Y MOJER
p. p. Firmador L. Gota Carafidea

412097

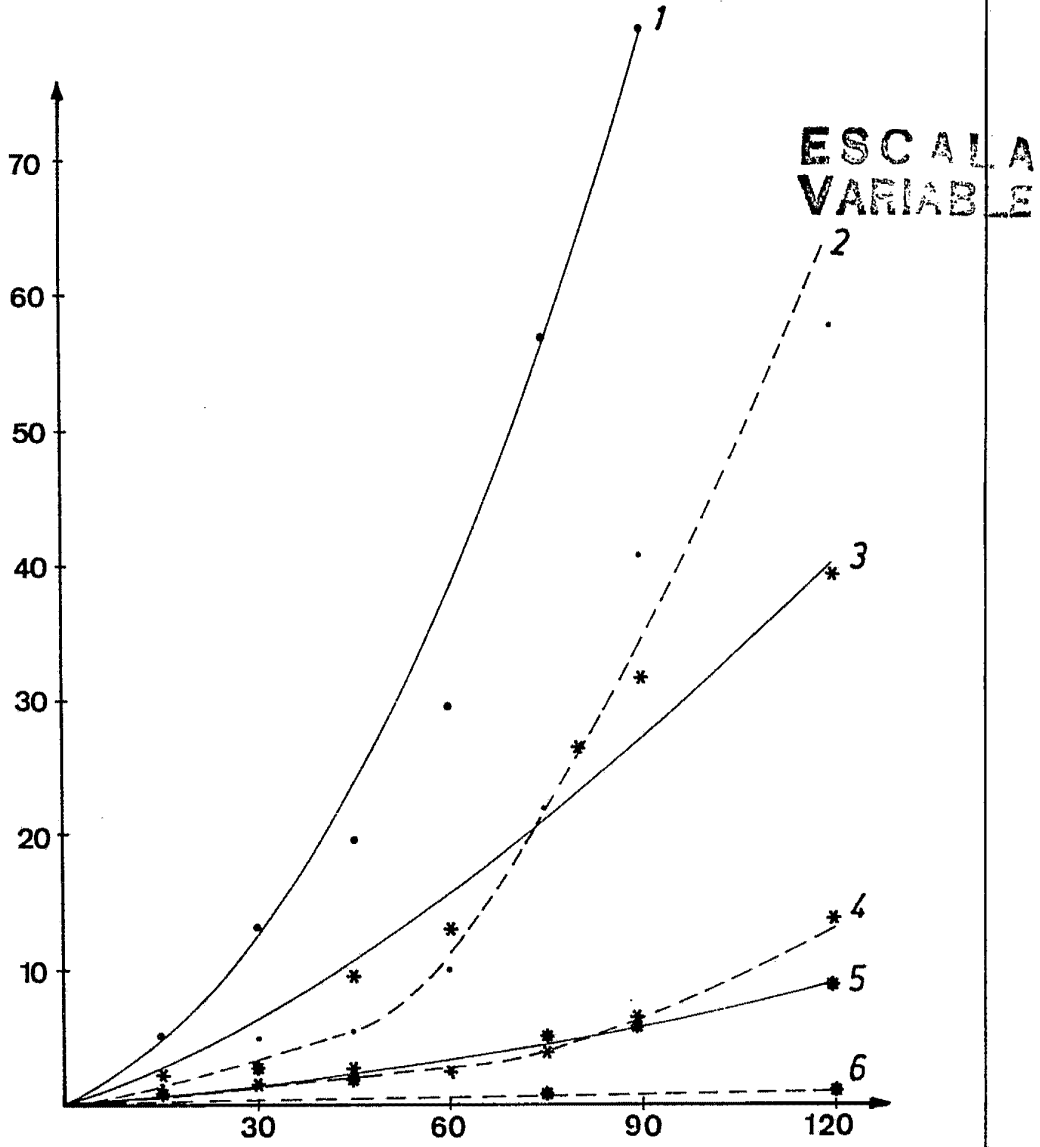


FIG. 2

27 FEB. 1973

Madrid

I. GOMEZ ACEBO Y MOJAT
p. p. Elmerdo L. Goeta Fernández

412097

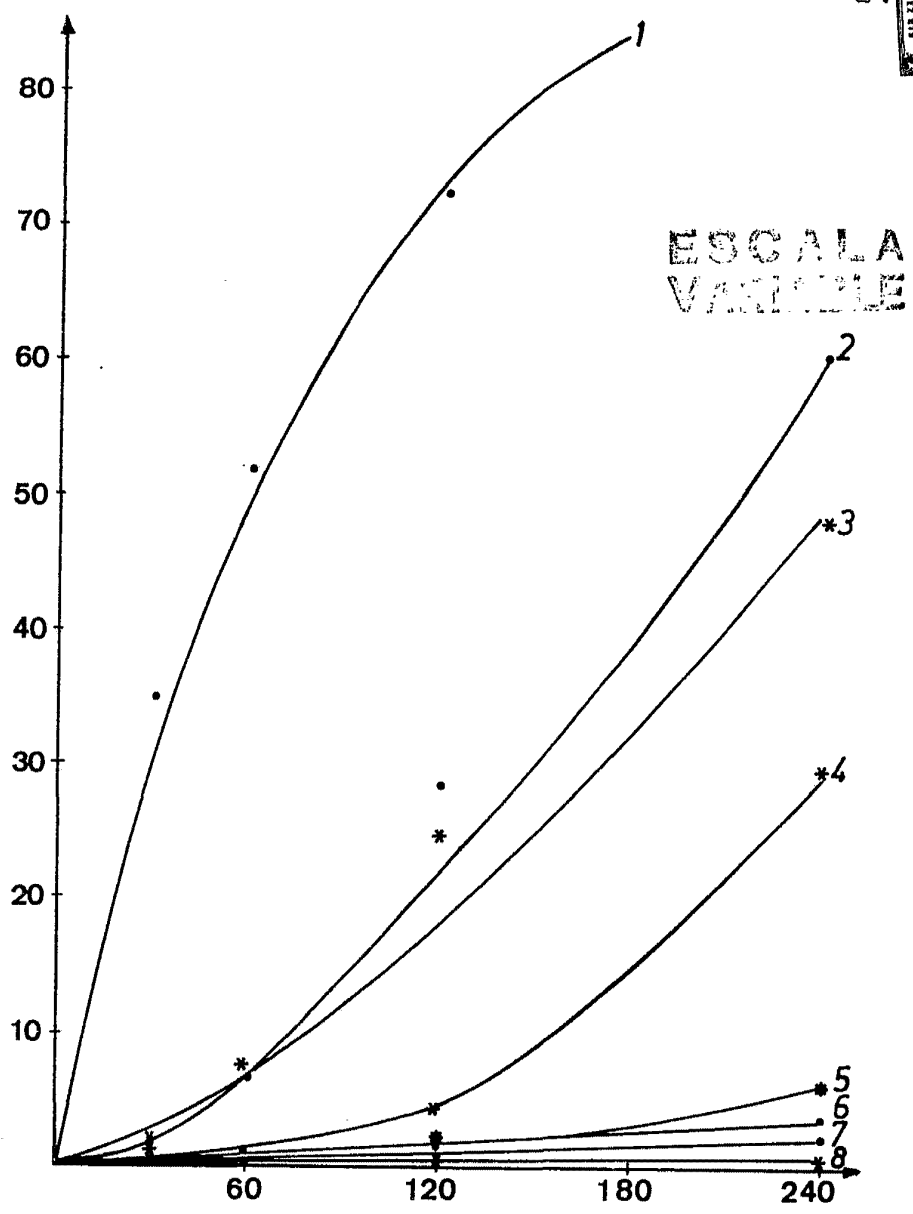


FIG. 3

27 FEB. 1973

Madrid

J. GOMEZ ACEBO Y MATEO
p. p. Encargado L. Costa Fernández
[Handwritten Signature]