



412098

PATENTE DE INVENCION

Le A 14 203-Sp.

Int. Cl.: C12D

F.C. 16-4-75

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE INHIBIDORES DE
SACARASA.

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

Constituye el objeto de solicitudes de pa-
tente anteriores (Solicitud de patente alemana P 20 64
092.0, solicitud de patente británica No. 59 939/71)
el conocimiento de que una serie de actinomicas forman
5. inhibidores de hidrolasas de glucósidos y, es decir,



5. particularmente inhibidores para hidrolasas de glicósidos preferiblemente de enzimas desdobladoras de hidratos de carbono del aparato digestivo. Un grupo de estos inhibidores es relativamente estable bajo la influencia de calor y a la temperatura ambiente es resistente a ácidos y álcalis. Estos inhibidores pertenecen químicamente a la clase de los oligo- o polisacáridos, respectivamente sus derivados.

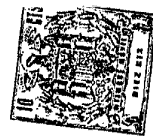
10. En las citadas solicitudes de patente, por ejemplo en los ejemplos 28 a 38 de la citada solicitud de patente alemana, se describe la obtención de un tal inhibidor de amilasa de la cepa de actinoplanáceas SE 50 perteneciente al orden de actinomicetales.

15. Las soluciones de cultivo de la cepa SE 50 a menudo tienen también una pequeña eficacia inhibidora de sacarasa.

20. La obtención y preparación en estado puro del inhibidor de sacarasa formado, sin embargo, llegan a ser sumamente difíciles debido a la existencia de considerables cantidades de inhibidor de amilasa en la solución de cultivo.

25. Ahora constituye el objeto de la invención un procedimiento, con el cual se logra reprimir la formación del inhibidor de amilasa y simultáneamente promover la formación del inhibidor de sacarosa. Se consiguen estos efectos con las siguientes medidas que, según el invento, pueden ser aplicadas individualmente o en forma combinada una con otra:

30. 1. Se emplea una solución de cultivo exenta de almidón.
2. Se agrega maltosa a la solución de cultivo.



3. Se interrumpe el cultivo brevemente antes de alcanzarse o en el momento de alcanzarse el contenido óptimo de inhibidor de sacarosa.

Resp. a 1.

5. Las soluciones de cultivo deben ser exentas de almidón. Así, en forma óptima, se obtienen soluciones de cultivo, por ejemplo de la composición: 3,5 % de glucosa, 0,5 % de hidrolizado de caseína, 1,3 % de extracto de levadura, 0,3 % de K_2HPO_4 , 0,3 % de $CaCO_3$; pH ajustado con KOH antes de la esterilización a 7,8, las cuales después de la fermentación durante varios días con la capa de actinoplanáceas SE 50 perteneciente al orden de actinomicetales y depositada en el Centraalbureau voor Schimmelcultures en Baarn, Holanda, bajo el No. CBS 961.70, dan caldos de cultivo que contienen más de 10 UIS/ml. A un contenido de 300 a 700 UIA/ml (unidades de inhibidor de amilasa), resulta una relación UIS/UIA de 15×10^{-3} - 30×10^{-3} ($f = UIS/UIA \times 10^3$).
- 10.
- 15.

Resp. a 2.

20. Puede aumentarse todavía la producción del inhibidor de sacarosa, si a la solución de cultivo se agrega maltosa. Si por ejemplo en la solución de cultivo arriba especificada se introduce un 1,5 % de maltosa, se obtienen caldos de cultivo con un contenido de por ejemplo 16 a 18 y hasta de 24 UIS/ml.
- 25.

Resp. a 3.

30. Decisiva para la relación de UIS/UIA es la duración del cultivo. Si se interrumpe el cultivo brevemente antes o justamente en el momento de alcanzarse el contenido máximo de UIS, lo que según la inoculación pue-



de ser el caso ya con una fermentación de 1,5 a 2 días, se obtienen valores f de hasta 180.

En lugar de la cepa SE 50, según la invención pueden emplearse también sus mutantes y variantes, por ejemplo la cepa SE 50 / 13 (CBS-No. 614.71).

5.

La obtención del principio inhibidor de sacarosa de las soluciones de cultivo correspondientemente fermentadas, procede ya sea por concentración de los cal-

10.

dos de cultivos en vacío hasta 1/10 a 1/20 del volumen original con subsiguiente liofilización o sea por precipitación de las soluciones concentradas con 4 a 10 partes

15.

en volumen de disolventes orgánicos, tales como alcoholes o cetonas, preferiblemente con 5 a 9 partes en volumen de acetona, o bien de un modo particularmente sencillo por

20.

adsorción del principio inhibidor desde la solución de cultivo neutra sobre un 0,5 a 4 %, preferiblemente 1 a 2 % de carbón activo y por subsiguiente desadsorción con alcoholes acuosos o acetona particularmente a valores pH ácidos, de preferencia con acetona al 50 % a un pH de 2 a

25.

3. Subsiguientemente, lo desadsorbido es concentrado en vacío hasta 1/50 a 1/200, preferiblemente 1/100 del volumen de partida (de la solución de cultivo) y a continuación es precipitado con disolventes orgánicos, de preferencia con acetona. Por lo general, para la obtención de preparados más puros, se efectúa una adsorción previa de los colorantes pardos que contaminan la solución de cultivo, sobre 1 a 2 % de carbón activo a valores pH ácidos (valores pH de 1 a 4, preferiblemente de 2 a 3) a los cuales la adsorción de la sustancia activa sorprendentemente

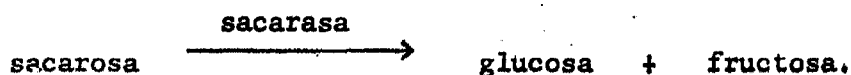
30.

aún no ocurre a un grado notable.



Es conocido que en animales y seres humanos, después de comer productos alimenticios y deleitosos conteniendo sacarosa, ocurren hiperglucemias que son provocadas por un desdoblamiento rápido de la sacarosa por sacarosas del aparato digestivo según el siguiente esquema

5.



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

10.

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

15.

Además, es conocido que, después de comer productos deleitosos y alimenticios que contienen sacarosa, la caries ocurre en forma particularmente fuerte y frecuente [por ejemplo W.Gold: Advances in Applied Microbiology 11, (1969) 135-157]. Una inhibición del desdoblamiento de sacarosa por inhibidores obtenidos según la invención disminuye la formación de sustancias cariogénas.

20.

25.

Por ello, estos inhibidores se prestan particularmente bien como productos terapéuticos para las siguientes indicaciones:

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

30.



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.

5. Formas de preparación: Pastillas, grageas, cápsulas, soluciones, suspensiones, granulados, goma de mascar, pasta dentífrica y como aditivo a productos alimenticios y/o delectuosos que contienen sacarosa.

Ensayo de amilasa.

10. 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 la cantidad de enzima que desdobra en un minuto bajo las condiciones de ensayo abajo indicadas 1 μ
15. equivalente de ligaduras glucosídicas en el almidón. Las μ Val ligaduras desdobladas se determinan, como μ Val. de azúcares reductores formados, colorimétricamente con ácido dinitrosalicílico y se indican con la ayuda de una curva de graduación de maltosa como μ Val equivalentes
20. de maltosa. Para la realización del ensayo, 0,1 ml de solución de amilasa (20 a 22 UA/ml) se mezcla con 0 a 10 μ g de inhibidor ó 0 a 20 μ g 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 equilibra durante unos 10 a
25. 20 minutos en un baño de agua de 35° C. Entonces se incuba durante 5 minutos con 0,5 ml de una solución al 1 % de almidón precalentada a 35° C (almidón soluble de la casa Merck, Darmstadt, No. 1252) a la temperatura de 35° C y subsiguientemente se agrega bajo mezclamiento 1 ml de reactivo de ácido dinitrosalicílico (según P. Bernfeld en
- 30.



5. Colowick-Kaplan, Meth. Enzymol, Tomo 1, página 149). Para el desarrollo de color, se calienta la preparación durante 5 minutos sobre el baño de María, entonces se enfría y se la mezcla con 10 ml de agua destilada. Se mide la extinción a 540 nm 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 ésta se calcula la inhibición porcentual de la amilasa aplicada. La inhibición porcentual es trazada como función del cociente
- 10.

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

15. (+ 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 convierte en UIA/mg de inhibidor.

Ensayo de sacarasa

20. Una unidad de inhibidor de sacarasa (UIS) se define como la cantidad de inhibidor capaz de inhibir dos unidades de sacarasa al 50 %. Una unidad de sacarasa (US) es la cantidad de enzima que en un minuto bajo las condiciones de ensayo abajo indicadas desdobra 1 μ mol de sacarosa en glucosa y fructosa. El μ mol de glucosa formada se determina cuantitativamente con ayuda de la reacción de oxidasa de glucosa, bajo condiciones, en las cuales un desdoblamiento ulterior de sacarosa por la sacarasa ya no ocurre más. Para la realización del ensayo, 0,05 ml de una solución de sacarasa ¹⁾ ajustada a 0,12 US, se mezclan con
- 25.
- 30.



- 0 a 20 μg de inhibidor ó 0 a 20 μl de la solución a ensayar y la mezcla se completa con maleinato de sodio tampón 0,1-molar. pH = 6,0, hasta 0,1 ml. Se equilibra durante 10 minutos a 35° C y entonces se agrega bajo mezclamiento 0,1 ml de una solución de sacarosa 0,01-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 interrumpe 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. Para la evaluación, se calcula la inhibición porcentual de la sacarasa aplicada y del punto de inhibición al 50 %, con ayuda de una curva de graduación de glucosa, se la convierte en UIS/g, respectivamente UIS/litro.

-
- 1) Sacarasa solubilizada de 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, hasta el contenido correspondiente de US.
- 2) El reactivo de oxidasa de glucosa es preparado por disolución de 2 mg de oxidasa de glucosa (casa Boehringer No. 15 423 EGAB) en 100 ml de tris-HCl tampón 0,565-molar, pH = 7, y por subsiguiente adición de 1 ml de solución de detergente (2 g. de Triton 100 + 8 g. de etanol al 95 % p.a.), 1 ml de una solución de dianisidina (260 mg de o-dianisidina 2 HCl en 20 ml de H₂O) y 0,5 ml de una solución acuo-



sa al 0,1 % de peroxidasa (casa Boehringer No. 15 302 EPAP).

Ejemplo 1.

- 5. Si se inocula un matraz de Erlenmeyer de una capacidad de 1 litro que contiene 120 ml de una solución de cultivo de la composición: 3,5 % de glucosa, 0,5 % de hidrolizado de caseína, 1,3 % de extracto de levadura, 0,3 % de CaCO₃, 0,3 % de K₂HPO₄, ajustada antes de la esterilización, con KOH, a un valor pH de 7,8 y entonces
- 10. esterilizada durante 30 minutos a 121° C, con 4 ml de un cultivo previo de 3 días de edad de la cepa SE 50 en una solución de cultivo de la composición: 3 % de glicerina, 3 % de harina de soya, 0,2 % de CaCO₃, obtenido por incubación sobre una máquina agitadora cilíndrica hasta 28° C,
- 15. incubando a 24° C, se obtiene un caldo de cultivo que contiene, después de una incubación durante 3 días 9,1 UIS/ml y 240 UIA/ml y, después de una incubación durante 4 días 10,4 UIS/ml y 675 UIA/ml.

Ejemplo 2.

- 20. Si a una solución de cultivo según el Ejemplo 1, se agrega maltosa en distintas concentraciones y se inocula y se incuba según el Ejemplo 1, se obtienen los siguientes rendimientos de UIS/ml y de UIA/ml:

25.	Concentración de maltosa %	al cabo de 3 días		al cabo de 5 días	
		UIA/ml	UIS/ml	UIA/ml	UIS/ml
	0	363	11,2	444	8,8
	0,5	479	12,7	614	11,3
	1,0	383	13,6	688	12,5
30.	1,3	337	15,7	725	12,7



Concentración de maltosa %	al cabo de 3 días		al cabo de 5 días	
	UIA/ml	UIS/ml	UIA/ml	UIS/ml
1,8	274	16,6	678	14,4
2,2	287	16,8	600	15,5

5.

Ejemplo 3.

10.

Si se inocula y se incuba una solución de cultivo según el Ejemplo 1, la que contiene adicionalmente 1,3 % de maltosa, se obtiene un caldo de cultivo que contiene, después de una fermentación durante 2 días, 14,4 UIS/ml y 81 UIA/ml y, después de una fermentación de 4 días, 14,5 UIS/ml y 580 UIA/ml.

Ejemplo 4.

15.

20.

25.

Si se inocula un matraz de Erlenmeyer de una capacidad de 1 litro que contiene 120 ml de una solución de cultivo de la composición: 3 % de glucosa, 1 % de maltosa, 0,5 % de hidrolizado de caseína, 1,3 % de extracto de levadura, 0,3 % de CaCO₃, 0,3 % de K₂HPO₄, ajustada antes de la esterilización, con Na₂CO₃, a un valor pH de 7,2 y esterilizada durante 30 minutos a 121° C, con 4 ml de un cultivo previo, de 3 días de edad, de la cepa SE 50 en una solución de cultivo de la composición: 3 % de glicerina, 3 % de harina de soya, 0,2 % de CaCO₃, obtenida por incubación sobre una máquina agitadora cilíndrica hasta 28° C, incubando a 24° C, se obtiene un caldo de cultivo que, después de una incubación de 4 días, contiene 22 UIS/ml y 500 UIA/ml.

Ejemplo 5.

30.

500 ml de una solución de cultivo parda de la



5. cepa SE 50 con 22 000 UIS/litro que se hizo fermentar según el Ejemplo 4, se ajustaron con HNO_3 semiconcentrado a un valor pH de 2,5, se mezclaron con 5 g. de carbón activo (de la casa Merck) y se agitaron durante 10 minutos. Se centrifugó durante 15 minutos a 10.000 r.p.m. y se neutralizó con amoníaco el sobrenadante claro de color amarillo. Subsiguientemente se concentró bajo rotación en el evaporador giratorio a 20 mm Hg hasta 50 ml y se mezcló esta solución concentrada con 50 ml de acetona para la precipitación de componentes inactivos. Se instiló el filtrado claro bajo agitación en 400 ml de acetona y se recogió el precipitado formado sobre un filtro de succión, se lo lavó con acetona y éter y se lo secó en vacío a la temperatura ambiente.
10. Rendimiento: 1,4 g. con 6000 UIS/g $\hat{=}$ un rendimiento al 70 %, calculado sobre la actividad.
- 15.

Ejemplo 6.

20. 500 ml de una solución de cultivo de la cepa SE 50 con 22 000 UIS/litro, la que se hizo fermentar según el Ejemplo 4, se elaboraron según el Ejemplo 5, pero no se precipitó con acetona, sino con etanol. Rendimiento: 0,6 g con 7000 UIS/g $\hat{=}$ un rendimiento al 38 %, calculado sobre la actividad.

Ejemplo 7.

25. Un litro de una solución de cultivo (21 000 UIS/litro) de color pardo oscuro, fermentada análogamente al Ejemplo 4, se ajustó con ácido nítrico semiconcentrado al valor pH de 2,5, se lo mezcló con 10 g. de carbón activo (de la casa Merck) y con 10 g. del agente auxiliar de filtración Clarcell y se agitó durante 10 minutos.
- 30.



- Sobre un filtro de succión provisto de una capa de 1 a 2 cm de espesor de Clarcell se filtró y se neutralizó el filtrado con amoníaco. Se desechó la torta de filtración. Al filtrado neutro (19 000 UIS/litro) se agregó 1,5 % de carbón activo y se agitó durante 10 minutos, luego volvió a filtrarse a succión. El filtrado contenía todavía aproximadamente 10 % de la actividad y fué desechado. (si esta actividad restante ha de ser obtenida todavía, vuelve a adsorberse con 0,5 % de carbón activo y se reúnen los residuos de carbón). El residuo de carbón que contiene la actividad de sacarasa, fué lavado con un poco de agua y subsiguientemente se lo agitó tres veces durante 10 minutos cada vez con 50 ml de acetona al 50 %, pH = 2,5 (HCl), para la desadsorción de la actividad. Cada vez se filtró a succión y los tres desadsorbatos se reunieron. Se concentró en el evaporador giratorio hasta 10 ml y se mezcló el concentrado viscoso con igual volumen (10 ml) de metanol bajo agitación. Se separó por centrifugación el precipitado formado. Entonces se instiló la solución metanólica al 50 % clara y de color pardo amarillento en 250 ml (= 12,5 volúmenes) de acetona absoluta bajo agitación. El precipitado formado se sedimentó bien; después de la decantación del sobrenadante de color amarillo intensivo, se recogió el precipitado con acetona absoluta y se lo lavó. Se lo recogió entonces por filtración a succión y se lo lavó todavía una vez con acetona absoluta y otra vez con éter. Subsiguientemente se lo secó en vacío a la temperatura ambiente.
- Rendimiento: 850 mg con 12 500 UIS/g $\hat{=}$ un rendimiento al 51 % (calculado sobre unidades en el caldo de cultivo).



Tabla 1 para el Ejemplo 7.

(Rendimientos de actividad de la elaboración)

Etapa de elaboración	Volu men (ml)	UIS/ litro	UIA/ litro	$f = \frac{UIS}{UIA} \times 10^3$	UIS	rendimiento de UIS (%)
1) Solución original	1000	21000	0.5×10^6	42	21000	100
2) después de la primera adsorción sobre carbón activo (pH 2,5)	1000	19000	0.4×10^6	48	19000	90
3) después de la segunda adsorción sobre carbón activo (pH 7,0)	1000	2000			2000	(desechado: 10%)
4) prim. des-adsorbato	45	260000	3.5×10^6	75	11500	55
5) seg. des-adsorbato	45	92000	2×10^6	46	4100	19,5
6) terc. des-adsorbato	45	30000	0.75×10^6	40	1350	6,5
7) concentrado bajo rotación hasta 10 ml	10	1500000	22×10^6	68	15000	72
8) precipitación con metanol al 50% (filtrado)	18	730000	12×10^6	61	13200	63
9) sobrenadante de la precipitación con acetona	260	8400			2200	(desechado: 10%)
10) precipitado	0.85 g	12500/g	$0.22 \times 10^6/g$	56	10600	51

} 81



Ejemplo 8.

Métodos de ensayo para la comprobación del efecto de inhibidores de sacarasa en ratas.

- 5. Para provocar una hiperglucemia alimenticia y una hiperinsulinemia, unas ratas en ayunas (n = 6) reciben 2,5 g/kg de sacarosa por vía bucal. Otras 6 ratas reciben adicionalmente a la sacarosa el inhibidor de sacarasa, preparado análogamente al Ejemplo 5, en la dosificación indicada. La glucosa en la sangre y la insulina en el suero son examinadas a los intervalos de tiempo indicados a contar de la administración de sacarosa. Las pruebas de sangre son tomadas del plexus venoso retroorbital. Se determinan la glucosa en la sangre en el analizador automático [Technicon [®]], según Hoffman: J. biol-Chem. 120, 51 (1937) 7, y la insulina en el suero según el método de Hales y Randle: Biochem. J. 88, 137 (1963).

Tabla 1 para el Ejemplo 8.

Valores medios de la glucosa en la sangre en mg/100 \pm 1s de ratas en ayunas a distintos tiempos a contar de la administración oral de sacarosa \pm sustancia activa análoga al Ejemplo 5.

Dosis/kg per os	10	20	30	60	120 minutos
Testigo sin sacarosa	67 \pm 7,1	72 \pm 4,6	68 \pm 5,3	66 \pm 5,0	71 \pm 3,3
testigo con sacarosa	134 \pm 15	140 \pm 16	126 \pm 12	117 \pm 20	103 \pm 3,0
100 UIS en sacarosa	96 \pm 4,4	93 \pm 6,2	92 \pm 5,6	92 \pm 3,4	95 \pm 12
----- P < 0,05	-----	-----	-----	-----	-----
	===== P < 0,001 en relación al testigo con sacarosa				



Tabla 2 para el Ejemplo 8.

Valores medios de la insulina en el suero en μ unid./ml \pm ls de ratas en ayunas a distintos tiempos a contar de la administración oral de sacarosa \pm substancia activa análoga al Ejemplo 5.

Dosis/kg per os	10	20	30	60	120 minutos
Testigo sin sacarosa	8,8 \pm 1,8	9,8 \pm 1,4	10,8 \pm 2,3	10,7 \pm 4,6	8,1 \pm 0,7
testigo con sacarosa	22,2 \pm 11	35,3 \pm 14	19,3 \pm 5,0	16,7 \pm 5,3	8,1 \pm 1,1
100 UIS en sacarosa	9,9 \pm 4,3	11,1 \pm 3,5	7,6 \pm 1,7	14,8 \pm 3,8	10,2 \pm 2,8

----- P < 0,05 ----- P < 0,01 ===== P < 0,001 en relación al testigo con sacarosa.

NOTA

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. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente, presentada en Alemania, con fecha 1 de marzo de 1972, bajo el número P 22 09 834.6; 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: PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE INHIBIDORES DE SACARASA; caracterizándose por lo siguiente:

1.- Procedimiento para la producción de inhi-



- 16 - 412098

27



bidores de sacarasa, caracterizado porque comprende cultivar la cepa de actinoplanáceas SE 50 en un medio de cultivo exento de almidón y aislar los inhibidores del medio de cultivo.

5. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se agrega maltosa al medio de cultivo.

10. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se interrumpe el cultivo en un tiempo brevemente antes hasta el momento de alcanzarse un contenido óptimo de inhibidor de sacarosa.

4.- Procedimiento para la producción de inhibidores de sacarasa, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

15. Esta Memoria consta de 16 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

27 FEB. 1973

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

J. GOMEZ ACEBO Y MODEX

p. p. Firmador L. Goeta Fernández