



F.P. 2-6-75

Int. Cl.²: A61K

413918

413918

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO., LTD.

RESIDENCIA: No 25 Dosho-machi 3-chome, Higashi-ku

Osaka-shi, Osaka-fu, JAPON.

ENUNCIADO: UN METODO DE ESTABILIZACION DE UN ENZI

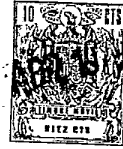
MA LITICO DE LAS CELULAS DE MICROORGA-

NISMOS.

Prioridad: Patente japonesa n.º 040805/1972 del 22.4.72

rmb.

413918



1 Esta invención se refiere a un método de estabi-
lización de enzimas líticos de células de microorganismos y a
composiciones estables que contienen el enzima y un estabili-
zante. Más especialmente, se refiere a un método de estabili-
5 zación de un enzima capaz de escindir las células de los mi-
croorganismos, especialmente de los microorganismos que indu-
cen la caries dental del género Streptococcus, como los
estreptococos cariogénicos (v.g. Streptococcus mutans o
Streptococcus salivarius) y a composiciones estables que con-
10 tienen el enzima y un estabilizante.

Con anterioridad se han realizado estudios para
encontrar en la naturaleza un microorganismo capaz de produ-
cir un enzima lítico de las células de los microorganismos
inductores de la caries dental y se han encontrado algunos mi-
15 croorganismos del género Streptomyces, v.g. la variedad S-1
(Streptomyces diastatochromogenes: ATCC nº 21481, FERM-P nú-
mero 326), variedad H-191 (Streptomyces farinosus: ATCC nú-
mero 21482, FERM-P nº 327), la variedad H-402 (Strepto-
myces griseus var. H-402: ATCC nº 21483, FERM-P nº 328) y la
20 variedad B-1829 (Streptomyces globisporus: ATCC nº 21553,
FERM-P nº 596), donde ATCC significa American Type Culture
Collection, U.S.A. y FERM significa Fermentation Research
Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Japón.

25 Estos microorganismos del género Streptomyces
son capaces de producir un enzima que puede escindir las célu-
las de los microorganismos inductores de la caries dental por
cultivo en un medio adecuado. De esta forma, el enzima obteni-
do es útil en la prevención y tratamiento de la caries dental
y, por lo tanto, puede ser mezclado con diversos vehículos con-
30 vencionales, como agua, pasta dentífrica, polvos dentales,

413918



1 unguentos y similares, para formar composiciones para la pre-
vención y tratamiento de la caries dental. Además, este enzi-
ma presenta actividad lítica sobre las células de otros micro
organismos y es útil para inhibir la propagación de los micro
5 organismos en otros campos, por ejemplo como antiséptico de
vinos y alimentos.

Sin embargo, este enzima es inestable al calor
y, por ejemplo, pierde la mayoría de su actividad cuando la
solución acuosa del mismo se mantiene a 80°C durante 20 mi-
10 nutos y pierde alrededor del 80 % de la actividad cuando se
mantiene a 55°C durante 20 minutos. Además, cuando las com-
posiciones del enzima se preservan a la temperatura ambiente
durante un largo tiempo, el enzima se inactiva gradualmente.
Por lo tanto, este enzima es muy inestable y las unidades del
15 enzima serán reducidas en la etapa de preparación de las
composiciones que contienen el enzima o en la preservación
de las composiciones. A la vista de estos inconvenientes, se
ha tratado de encontrar un estabilizante adecuado para estabi-
lizar este enzima y entonces se ha hallado que algunos estabi-
20 lizantes son útiles para este fin.

Un objeto de esta invención es proporcionar un
método de estabilización de un enzima lítico de las células de
microorganismos, que se obtiene por cultivo de un microorganism
mo del género Streptomyces.

25 Otro objeto de esta invención es proporcionar
una solución o polvo enzimático estable que contiene el enzi-
ma citado y un estabilizante.

Otro objeto de esta invención es proporcionar
composiciones estables para la prevención y el tratamiento de
30 la caries dental, que contienen el enzima citado y un estabi-



413918

1 lizante en mezcla con un vehículo.

Estos y otros objetos resultarán evidentes en la descripción que sigue.

5 Como resultado de intensos estudios durante largo tiempo, se ha encontrado ahora que estos enzimas o composiciones pueden estabilizarse mezclándolos por lo menos con uno de los estabilizantes seleccionados entre carboximetilcelulosa o su sal sódica (en adelante denominada simplemente "CMC"), glicerina y monoetanolamina.

10 De acuerdo con esta invención, cuando un enzima lítico de células de microorganismos, producido por cultivo de un microorganismo del género Streptomyces o una composición que contiene dicho enzima se mezcla con por lo menos uno de los estabilizantes seleccionados entre CMC, glicerina y mo
15 noetanolamina, puede ser preservado en un estado extraordinariamente estable durante largo tiempo.

Cuando se emplea como estabilizante CMC, se prefiere disolver la CMC en agua junto con el enzima o en una solución acuosa que contiene el enzima y después separar el
20 agua de la solución enzimática por liofilización o similar para dar un polvo enzimático o una composición sólida enzimática estables. Habitualmente, el polvo enzimático se disuelve en una solución acuosa de CMC a una concentración apropiada y la solución así obtenida se liofiliza para dar un polvo es-
25 table de CMC-enzima y, si se desea, el polvo se mezcla con otros vehículos para formar una composición estable que contiene el enzima.

No existe ninguna limitación particular al tipo y calidad de la CMC y pueden utilizarse diversos grados
30 de CMC, pero es adecuado un tipo soluble en agua, especialmen-



413918

1 te su sal sódica.

5 La relación de CMC al enzima de esta invención puede ser de alrededor de 0,3 o más partes en peso de CMC a una parte en peso del enzima. La proporción preferida de CMC
10 puede estar comprendida aproximadamente entre 0,3 y 5 partes, todavía mejor entre 0,7 y 2 partes en peso por cada parte en peso del enzima. Cuando se utiliza CMC en una proporción menor que el límite inferior de este intervalo, no se consigue el efecto estabilizante deseado y, por otra parte, cuando se
15 utiliza CMC por encima del límite superior del intervalo, el efecto estabilizante no aumenta y, por lo tanto, no se consigue ninguna nueva ventaja del uso de una cantidad tan alta de CMC.

15 La glicerina y la monoetanolamina son eficaces para estabilizar las composiciones del enzima en estado acuoso, para lo que pueden ser utilizadas solas o en combinación. Para la preparación de una composición acuosa estable, la glicerina y/o la monoetanolamina se agregan al agua que contiene el enzima, que también puede contener otros componentes
20 tales como un regulador de pH (v.g. regulador de fosfato 0,02 M) y después la mezcla se agita bien para formar una solución homogénea. Cuando se agrega monoetanolamina, puede ser neutralizada previamente a un pH de 6,7 a 7,0 aproximadamente mediante un ácido como el ácido acético.

25 La glicerina se utiliza dentro de un intervalo del orden de 45 a 70 %, preferiblemente del 50 al 65 % en peso y la monoetanolamina se utiliza a una concentración del orden de 10 a 32 % y preferiblemente del orden de 20 a 30 %
30 en peso. Cuando se utilizan a concentraciones fuera de estos límites, no se alcanza el efecto estabilizante deseado.



413918

1 La composición acuosa estable así obtenida puede ser preservada a gran concentración y cuando se utiliza se diluye con agua y se emplea, por ejemplo, como enjuague bucal.

5 El polvo o solución enzimáticos estabilizados o las composiciones que contienen el enzima de acuerdo con esta invención son extraordinariamente estables y pueden ser preservados establemente durante largo tiempo. Por ejemplo, incluso cuando las composiciones o polvos enzimáticos estabilizados son conservados a la temperatura ambiente durante 10 un año o más, el enzima resulta poco inactivado y además, incluso aunque se conserve en condiciones severas, por ejemplo a temperatura elevada, durante varias decenas de horas a varios días, retienen suficientemente la actividad enzimática. 15 tica.

Esta invención es ilustrada mediante los siguientes ejemplos aunque no se limita a los mismos.

EJEMPLO DE REFERENCIA

20 La variedad B-1829 aislada se inocular en un medio de ágar inclinado que contiene 1 % de glucosa, 0,2 % de peptona, 0,1 % de extracto de levadura, 0,1 % de extracto de carne y 1,5 % de ágar y se cultiva a 30°C durante 7 días. Las esporas obtenidas se inoculan en un matraz Sakaguchi de 500 ml que contiene 50 ml de medio líquido (pH 7,5) conteniendo 2 % de dextrina, 0,5 % de harina de soja, 0,25 % de peptona, 0,5 % de fosfato disódico hidrógeno, 0,1 % de fosfato potásico dihidrógeno, 0,1 % de sulfato magnésico y 0,5 % de cloruro sódico y se somete a un cultivo agitado a 30°C durante 25 te 3 días. El caldo de cultivo así obtenido se separa por 30 filtración para dar 49,5 ml de solución enzimática. Esta últi

413918



1 ma se adsorbe sobre Amberlite IRC 50 (resina cambiadora de
ión fabricada por Rohm and Haas Co., U.S.A.) y se eluye con
fosfato sódico dihidrógeno 0,2 M (pH 7,5) y se precipita por
5 saturación con sulfato amónico hasta el 60 %. El precipitado
resultante se recoge y disuelve en agua y después se dializa
frente a agua corriente y se liofiliza para dar 10 mg de en-
zima en polvo.

En el procedimiento anterior, utilizando la
variedad aislada S-1, H-191 o H-402 en lugar de la variedad
10 aislada B-1829, se obtiene análogamente el polvo enzimático
deseado.

La unidad de actividad lítica de este enzima se
calcula de acuerdo con el siguiente método. Se mezclan 0,4 ml
de una suspensión de células intactas del microorganismo del
15 género Streptococcus, por ejemplo Streptococcus mutans BHT,
2 ml de una solución de enzima diluída hasta una concentra-
ción apropiada y 1,6 ml de solución reguladora de tri-HCl
0,025 M (pH 7,0) para dar un total de 4 ml. La mezcla se man-
tiene a 37°C durante 5 minutos para someterla a la reacción
20 de lisis celular. Después se mide la densidad óptica de la
mezcla de reacción a 600 mμ de un colorímetro fotoeléctrico
y se calculan las unidades de actividad lítica de este enzima de
acuerdo con la siguiente ecuación. Como control se utilizan
2 ml de agua en lugar de 2 ml de la solución de enzima.

25 Unidades/ml o mg = $\frac{(a - b) - (a - c)}{0,001.t.v} = \frac{c - b}{0,001.t.v}$

a: densidad óptica de la mezcla de reacción a 600 mμ, a tiem-
po de reacción cero

b: densidad óptica de la mezcla de reacción a 600 mμ, después
30 de un tiempo t (s)



413918

- 1 c: densidad óptica de la solución de control a 600 mμ, después de un tiempo t (s)
- t: tiempo de reacción (minutos)
- 5 v: cantidad (ml o mg) de solución de enzima o polvo original realmente utilizada.

EJEMPLO 1

En 1 ml de diversas soluciones acuosas (concentración: 0, 0,5, 1,0 y 3,0 % en peso) de carboximetilcelulosa sódica [Celogen FSB(viscosidad: 180-340 cps), fabricada por Dai-Ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.] se disuelven 15 mg del polvo enzimático obtenido en el Ejemplo de Referencia y la mezcla se liofiliza para dar un polvo de carboximetilcelulosa sódica-enzima. El polvo se deja en reposo a 80°C durante 4 días y después se mide la actividad residual del enzima. Los resultados se encuentran en la Tabla I.

TABLA I

Concentración de la solución acuosa de carboximetilcelulosa sódica (%)	Actividad residual del enzima*
0	48,6
0,5	76,5
1,0	83,1
3,0	100,0

* Actividad del polvo original antes de dejarlo en reposo a 80°C = 100

EJEMPLO 2

A 1 g de una pasta de base constituida por 5,0 partes en peso de Plastibase 50 W (base para pasta dental fabricada por E.R. Squibb and Sons, Inc.), 0,83 partes en peso de gelatina y 0,415 partes en peso de pectina, se añade el



413918

1 polvo de enzima-carboximetilcelulosa sódica obtenido en la
 forma descrita en el Ejemplo 1, de manera que contenga 10 mg
 de enzima y la mezcla se amasa bien para dar una pasta que
 contiene enzima. La pasta se deja en reposo a 80º C durante
 5 4 días y después se calcula la actividad residual del enzima.
 Los resultados se encuentran en la Tabla II.

TABLA II

Período de reposo (horas)	Concentración de solución acuosa de carboximetilcelulosa sódica (% en peso)		
	0,5	1,0	3,0
0	100,0	100,0	100,0*
3,0	75,3	100,0	100,0
6,0	61,4	100,0	100,0
12,0	46,0	100,0	96,8
96,0	36,6	79,0	86,3

* Actividad residual del enzima.

EJEMPLO 3

En 1 ml de varias soluciones acuosas a diversas con-
 centraciones de dos tipos de carboximetilcelulosa sódica -
 (Terucello H (viscosidad: 350 + 40 cps) y Terucello M (vis-
 20 cosidad: 600 + 50 cps), fabricadas por Showa Jushi Kogyo
 K.K.) se disuelven 15 mg del polvo enzimático obtenido en la
 forma descrita en el Ejemplo de Referencia y la mezcla se
 liofiliza para dar un polvo de enzima-carboximetilcelulosa
 25 sódica. El polvo se deja en reposo a 80º C durante 15 horas
 y después se mide la actividad residual del enzima. Los resul-
 tados están indicados en la Tabla III.

413918



1

TABLA III

<u>Carboximetilcelulosa sódica</u>		<u>Actividad residual del enzima (%)</u>
<u>Clase</u>	<u>Concentración</u>	
		82,2
5	Terucello H	0,5
		1,0
		2,0
10	Terucello M	0,5
		1,0
		2,0

EJEMPLO 4

En la forma descrita en el Ejemplo 1, se obtiene un polvo de carboximetilcelulosa sódica-enzima utilizando 1 ml de una solución acuosa al 1 % de carboximetilcelulosa sódica (Terucello M, fabricado por Showa Jushi Kogyo K.K.) y 15 mg del polvo enzimático obtenido en la forma descrita en el Ejemplo de Referencia. Utilizando el polvo de carboximetilcelulosa sódica-enzima, se prepara una pasta con la siguiente fórmula:

20		<u>mg</u>
	Plastibase 50 W	91,0
	Hidroxietilcelulosa	9,0
	Polvo de carboximetilcelulosa sódica-enzima	2,7
	Almidón α soluble	0,3
25	Sulfato magnésico	5,0
	Sacarina sódica	0,7
	Agente colorante	pequeña cantidad
	Aromatizante	pequeña cantidad

La pasta así obtenida es muy estable e incluso aunque se mantenga a la temperatura ambiente durante 12 meses

30

413918



1 no disminuye la actividad del enzima.

EJEMPLO 5

5 En la forma descrita en el Ejemplo 1, se obtiene un polvo de carboximetilcelulosa sódica-enzima utilizando 1 ml de una solución acuosa al 3 % de carboximetilcelulosa sódica (Celogen FSB, fabricado por Dai-Ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.) y 15 mg del polvo de enzima obtenido en la forma descrita en el Ejemplo de Referencia. Utilizando el polvo de carboximetilcelulosa sódica-enzima, se prepara una pastilla con la siguiente composición:

	<u>mg</u>
Manitol	278,2
Carboximetilcelulosa sódica	10,0
Polvo de carboximetilcelulosa sódica-enzima	3,0
15 Sulfato magnésico	5,0
Estearato magnésico	1,5
Sacarina sódica	0,3
Aromatizante	ligera cantidad

20 La pastilla así obtenida es muy estable y aunque se mantenga a la temperatura ambiente durante 12 meses, no disminuye la actividad del enzima.

EJEMPLO 6

25 Utilizando un polvo de carboximetilcelulosa sódica-enzima, obtenido en la forma descrita en el Ejemplo 4, se preparan gránulos efervescentes con la siguiente composición:

	<u>mg</u>
Acido tartárico	125
Carbonato sódico hidrógeno	188
Sulfato magnésico	12
30 Manitol	412



413918

1		<u>mg</u>
	Lactosa	250
	Sacarina sódica	5
	Levomentol	5
5	Polvo de carboximetilcelulosa sódica-enzima	3,7

Cuando los gránulos efervescentes así obtenidos se mantienen a la temperatura ambiente durante 12 meses, disminuye la actividad del enzima. Los gránulos se disuelven en unos 200 ml de agua cuando se utilizan y después se usan como enjuague bucal.

EJEMPLO 7

En 1 ml de solución reguladora de fosfato 0,01 M (pH 7,0) se disuelve 1 mg del polvo enzimático obtenido en el Ejemplo de referencia y se añade glicerina a las diversas concentraciones mencionadas en la siguiente Tabla IV. La mezcla se diluye con agua para hacer un total de 5 ml. La solución se deja en reposo a 60°C durante 30 minutos y después se mide la variación de actividad residual del enzima. Los resultados se encuentran en la Tabla IV.

20	<u>TABLA IV</u>				
	<u>Concentración de glicerina (% en peso)</u>	<u>Periodo de reposo (minutos)</u>			
		<u>0</u>	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>
	0	100	30	5	2*
	10	100	43	24	15
25	20	100	56	31	25
	30	100	60	36	31
	40	100	63	39	34
	50	100	73	69	59

* Actividad residual del enzima.



413918

1

EJEMPLO 8

5

10

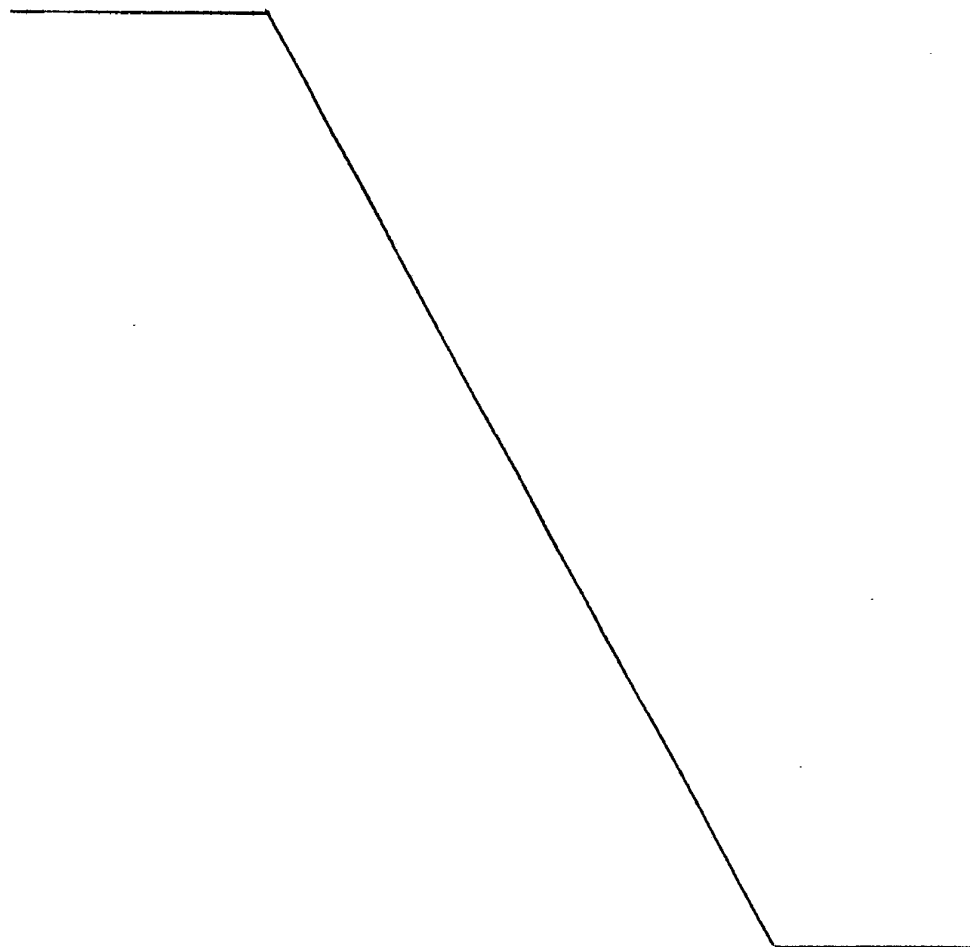
En agua y/o en solución reguladora de fosfato 0,02 M (pH 6,5) se disuelve el polvo de enzima obtenido en el Ejemplo de Referencia (el enzima se disuelve hasta una concentración final de 2 mg/ml). A la solución se añade glicerina o una solución de monoetanolamina neutralizada con ácido acético a pH de 6,5 aproximadamente y la mezcla se agita bien para formar una solución homogénea. La proporción de los componentes está indicada en la siguiente Tabla V. La solución así obtenida se deja en reposo a 40° o 50°C durante un mes y después se calcula la actividad residual del enzima. Los resultados se encuentran en la Tabla V.

15

20

25

30



413918

TABLA V

413918

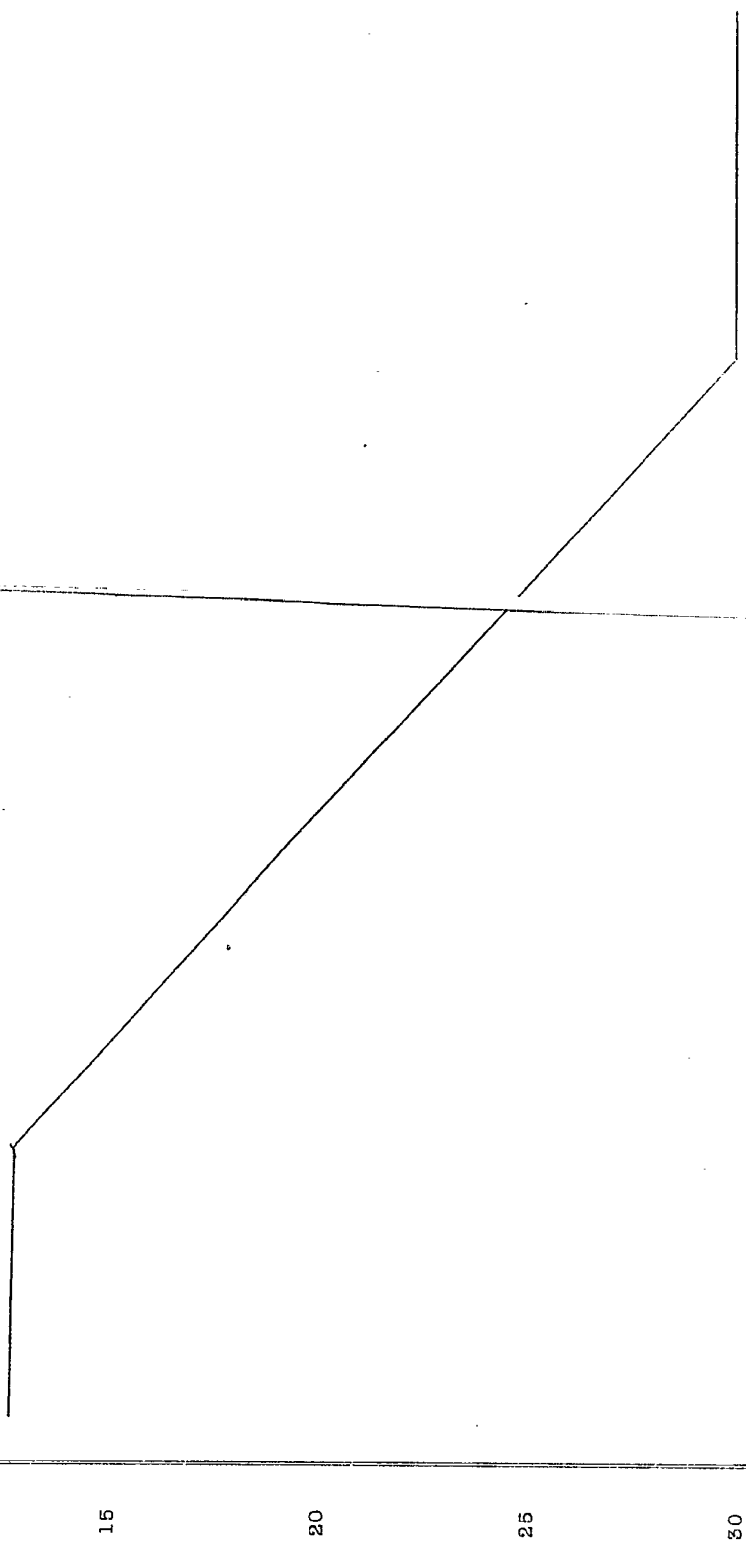
Componentes (partes en peso)

Actividad residual del enzima (%)

Agua	Regulador de fosfato	Glicerina	Monoetanol amina	40°C	50°C
+ (Control)	-	-	-	17	0
30	15	-	-	25	0
50	-	50	-	81	55
-	15	-	10*	80	66
-	15	30	10*	90	79
30	15	-	10*	100	62

*

Se utilizan 10 partes de ácido acético para la neutralización



413918

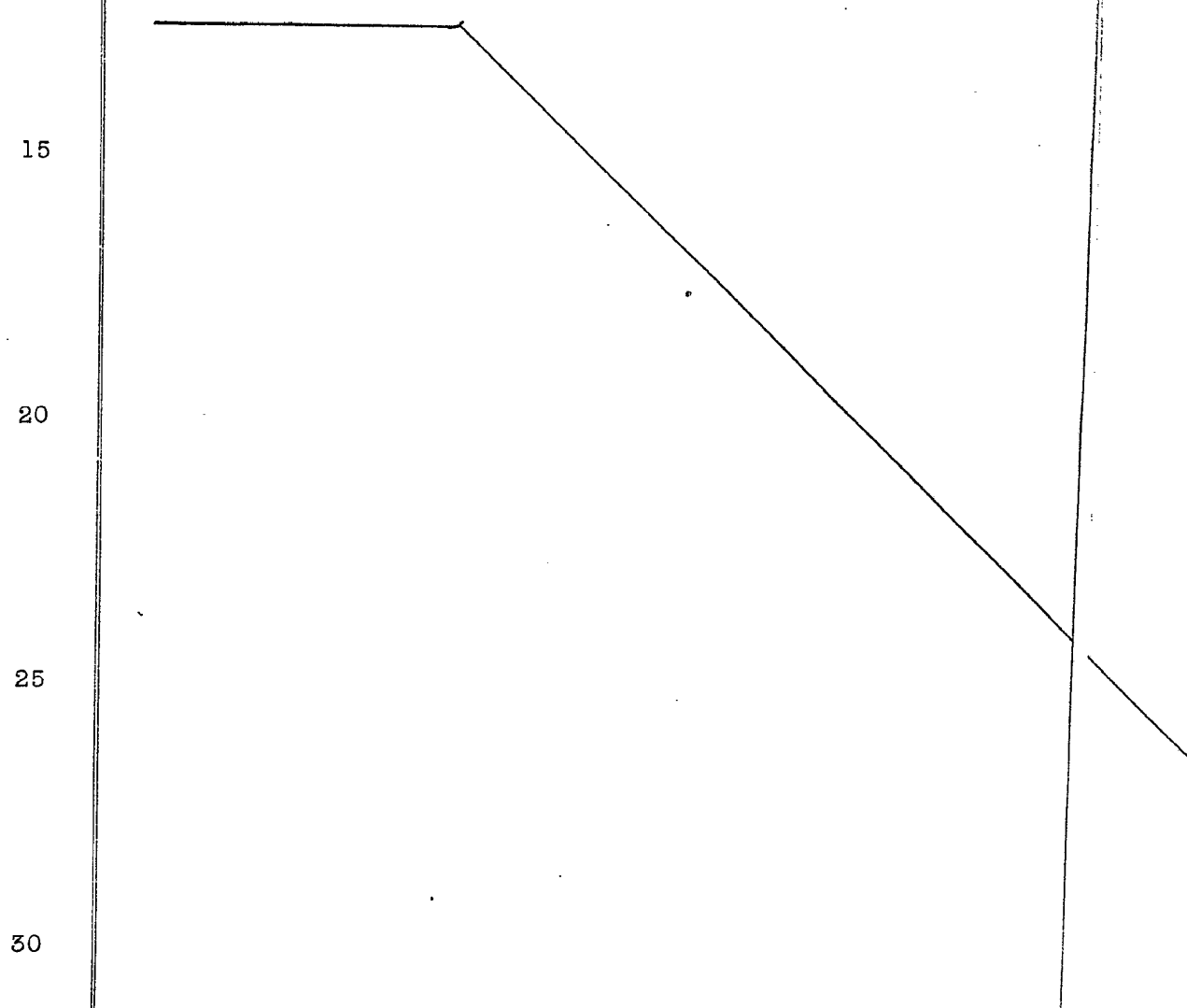
TABLA V

1

Componentes (partes en peso)

<u>Agua</u>	<u>Regulador de fosfato</u>	<u>Glicerina</u>	<u>Monoetanol amina</u>
+ (Control)	-	-	-
30	15	-	-
50	-	50	-
-	15	-	10*
-	15	30	10*
30	15	-	10*

10 *
Se utilizan 10 partes de ácido acético para la neutralización



10

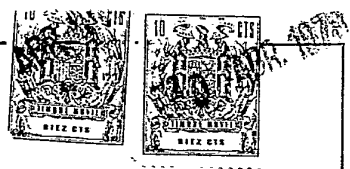


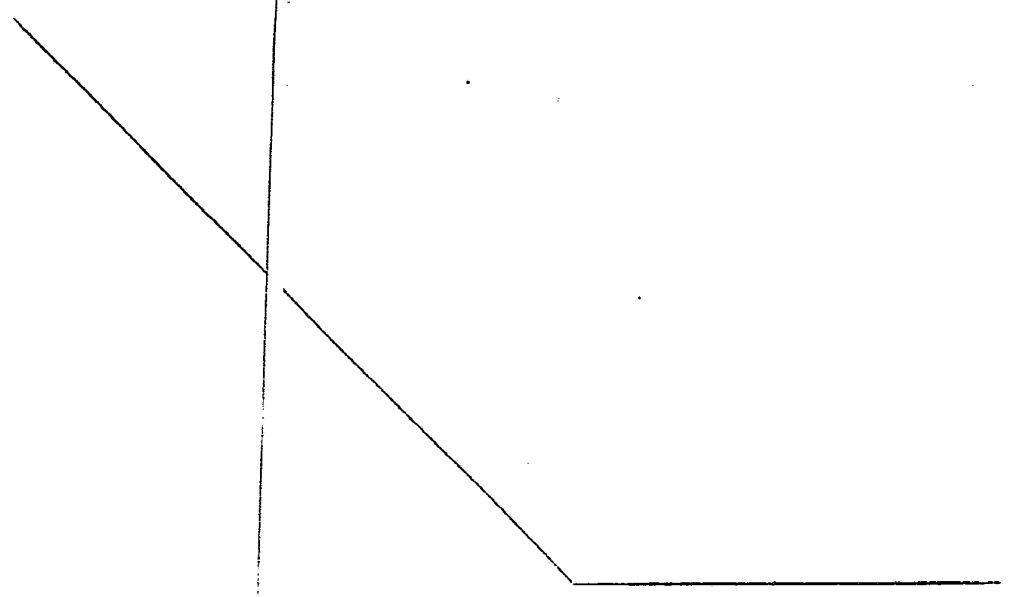
TABLA V

413918

Actividad residual del enzima (%)

Monoetanol amina	Actividad residual del enzima (%)	
	40°C	50°C
-	17	0
-	25	0
-	81	55
10 ^{3E}	80	66
10 ^{4E}	90	79
10 ^{5E}	100	62

la neutralización



413918



EJEMPLO 9

1 En 10 ml de solución reguladora de fosfato 0,01 M (pH 7,0) se disuelven 50 mg del polvo enzimático obtenido en el Ejemplo de Referencia y a la solución se añade glicerina

5 hasta diversas concentraciones, indicadas en la siguiente Tabla VI. La mezcla se deja en reposo a 60°C durante 20 minutos y después se mide la actividad residual del enzima. Los resultados se encuentran en la Tabla VI.

TABLA VI

10	<u>Concentración de glicerina (% en peso)</u>	<u>Actividad residual del enzima</u>
	0	9,6
	20	25,2
	33	48,9
15	42,8	44,6
	50	67,8
	55,6	67,8
	60	84,4
	63,6	76,0
20	67	63,7
	70	60,0

EJEMPLO 10

25 En 10 ml de solución reguladora de fosfato 0,01 M (pH 7,0) se disuelven 50 mg del polvo enzimático obtenido en el Ejemplo de Referencia y a la solución se añade monoetanolamina hasta diversas concentraciones, indicadas en la siguiente

30 Tabla VII. La monoetanolamina se neutraliza con un ácido acético a una concentración de 1:1 en peso. La mezcla se deja en reposo a 60°C durante 20 minutos y después se mide la actividad residual del enzima. Los resultados están indicados



413918⁹

1 en la Tabla VII.

TABLA VII

	<u>Concentración de monoetanolamina (% en peso)</u>	<u>Actividad residual del enzima</u>
5	0	9,6
	10	67,8
	16,5	71,4
	21,4	78,0
	25	76,9
10	27,8	89,5
	30	88,1
	31,8	60,6
	33,5	42,1

EJEMPLO 11

15 En 10 ml de solución reguladora de fosfato 0,01 M (pH 7,0) se disuelven 50 mg del polvo enzimático obtenido en el Ejemplo de Referencia y a la solución se añade glicerina hasta una concentración del 60 % en peso o monoetanolamina hasta una concentración del 30 % en peso. La mezcla se agita

20 bien y se deja en reposo a la temperatura ambiente durante un año aproximadamente y después se mide la actividad residual del enzima. En todas las mezclas se conserva alrededor del 100 % de la actividad.

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

REIVINDICACIONES

1. Un método de estabilización de un enzima lítico de las células de microorganismos, obtenido por cultivo de un microorganismo del género Streptomyces, que consiste en mezclar el enzima o la composición que contiene el enzima por

30

413918



1 lo menos con un estabilizante seleccionado entre el grupo
formado por carboximetilcelulosa o su sal sódica, glicerina
y monoetanolamina.

5 2. Un método según la Reivindicación 1, donde el
estabilizante es carboximetilcelulosa o su sal sódica.

3. Un método según la Reivindicación 2, donde la
carboximetilcelulosa o su sal sódica se utiliza en una pro-
porción comprendida aproximadamente entre 0,3 y 5 partes en
peso por cada parte en peso del enzima.

10 4. Un método según la Reivindicación 1, donde el
estabilizante es glicerina y/o monoetanolamina.

5. Un método según la Reivindicación 4, donde la
glicerina y la monoetanolamina se utilizan solas.

15 6. Un método según la Reivindicación 5, donde la
glicerina se utiliza a una concentración comprendida entre
45 y 70 % en peso aproximadamente.

7. Un método según la Reivindicación 5, donde la
monoetanolamina se utiliza a una concentración comprendida
aproximadamente entre 10 y 32 % en peso.

20 8. Un método según la Reivindicación 4, donde la
glicerina y la monoetanolamina se utilizan combinadas entresí.

25 9. Un método según la Reivindicación 1, donde el
microorganismo del género Streptomyces es un miembro selec-
cionado entre el grupo formado por Streptomyces diastatochro-
mogenes (ATCC nº 21418), Streptomyces farinosus (ATCC núme-
ro 21482), Streptomyces griseus var. H-402 (ATCC nº 21483)
y Streptomyces globisporus (ATCC nº 21553).



413918

1 10. Se reivindica por último como objeto sobre el que
ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN
METODO DE ESTABILIZACION DE UN ENZIMA LITICO DE LAS CELULAS
DE MICROORGANISMOS.

5 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la pre
sente Memoria descriptiva que consta de dieciocho páginas
mecanografiadas.

Madrid, 19 de Abril de 1.973

BERNARDO UNGRIA
P.p.

10

15

20

25

30