



19 ES	11	NUMERO	A1
	21	457,386	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		31-3-77	

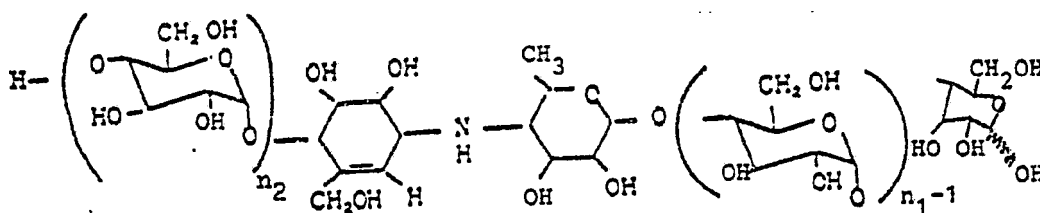
PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES:		
51 NUMERO	52 FECHA	53 PAIS
P 26 14 393.1	2.4.76	República Federal Alemana.
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D/AG1K	
54 TITULO DE LA INVENCION		
PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE AMINO-AZUCARES		
71 SOLICITANTE (S)		
BAYER AKTIENGESELLSCHAFT		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Leverkusen-Bayerwerk, República Federal Alemana		
72 INVENTOR (ES)		
Werner Frommer, Bodo Junge, Uwe Keup, Lutz Müller, Walter Puls, Delf Schmidt.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
GOMEZ-ACEBO		

La presente invención se refiere a nuevos derivados de aminoazúcar, a procedimientos para su obtención, a composiciones farmacéuticas, que contienen estos derivados de aminoazúcar como sustancias activas, así como a procedimiento para el control del metabolismo de carbohidratos en el ser humano y animales por inhibición de las hidrolasas de glucósido con ayuda de estos aminoazúcares, tal como, por ejemplo, para el tratamiento de la diabetes, adiposidad e hiperlipemia.

Ya es conocido que una serie de microorganismos del orden actinomicetales forman inhibidores para las hidrolasas de glucósido obteniéndose, según las condiciones de cultivo, inhibidores con efecto inhibitor principalmente de la amilasa o sacarasa (véase sobre esto las patentes US 3 876 766, 3 855 066 y 3 879 546).

Se han descubierto ahora los nuevos derivados de aminoazúcar de fórmula I



donde n_1 puede estar por una cifra de 1 a 8 y n_2 puede estar por una cifra de 0 a 8, teniendo la suma de $n_1 + n_2$, sin embargo, siempre un valor de $n = 1$ a 8, con la excepción de que en el caso de $n_1 + n_2 = 1$ ó 2, n_2 siempre será igual a 0.

Según el valor de la suma de $n_1 + n_2$, tienen estos derivados de aminoazúcar un efecto inhibitor principalmente de

la amilasa o bien sacarasa. Así, derivados de aminoazúcar, que en forma dirigida se pueden emplear para la inhibición de la amilasa, son aquéllos con $n_1 + n_2 = 4$ a 8, especialmente con $n_1 + n_2 = 4$ y 5. Los derivados de aminoazúcar, que se pueden
5 emplear en forma dirigida para la inhibición de la sacarasa, son aquéllos con $n_1 + n_2 = 1$ a 3, preferentemente con $n_1 + n_2 = 2$ a 3, con especial preferencia con $n_1 = 2$.

Asimismo se ha descubierto que, sorprendentemente, los derivados de aminoazúcar con $n_1 + n_2 = 1$ a 3, especialmente
10 con $n_1 = 2$, presentan in vivo una fuerte inhibición de la disociación de fécula.

La obtención de los derivados de aminoazúcar de la presente invención se efectúa por cultivo de cepas del orden de los actinomicetales, especialmente de la familia de los ac-
15 tinoplanaceae en forma en sí conocida y mediante ulterior separación y aislamiento de los distintos compuestos en forma en sí conocida.

Los derivados de aminoazúcar con valores en la suma de $n_1 + n_2$ de 1 a 4 se pueden obtener, además, por hidrólisis
20 química o enzimática de derivados de aminoazúcar de mayor peso molecular.

Como cepas del orden de los actinomicetales, que entran en consideración para la obtención de los derivados de aminoazúcar de la presente invención, sean mencionados, como
25 ejemplo SE 50 (CBS 961.70), SB 18 (CBS 957.70) y SE 82 (CBS 615.71), así como los mutantes o variantes de estas cepas. Con respecto al rendimiento en derivados de aminoazúcar, han demostrado ser especialmente bien adecuadas las cepas SE 50/13 (CBS 614.71) y SE 50/110 (CBS 674.73). Ambas cepas corresponden en
30 su descripción ampliamente a la cepa madre SE 50 (CBS 971.60),

de la que se obtienen estas cepas por selección natural sin la aplicación de mutágenos.

5 Para el cultivo de los microorganismos se emplean caldos de cultivo sólidos o líquidos, especialmente líquidos, acuosos, que contienen los productos de partida en sí conocidos para carbono y nitrógeno, sales y agentes antiespumantes en las concentraciones usuales.

10 Como productos de partida para el carbono sirven principalmente los carbohidratos, especialmente la fécula, maltosa, glucosa, así como mezclas de sustancias complejas, tales como, por ejemplo, extracto de malta comercial.

15 Como productos de partida para el nitrógeno entran en consideración las mezclas de sustancias complejas en sí conocidas, tal como, por ejemplo, el hidrolizado de caseína, el extracto de levadura, peptona, harina de pescado, agua de esponjamiento de maíz, extracto de carne, así como las mezclas de estos productos de partida, asimismo se pueden emplear aminoácidos individuales y/o sales amónicas como fuentes de nitrógeno.

20 El cultivo de los microorganismos se efectúa aeróbicamente en cultivos agitados ventilados o en cultivos en depósitos usuales.

25 La clase y la concentración de los productos de partida empleados para el carbono influencia junto con la cepa empleada en la fermentación correspondiente la clase del producto final formado principalmente.

30 Así, por ejemplo, en soluciones de cultivo, que contienen fécula en más de un 2 % en peso, se forman, ante todo, compuestos con $n_1 + n_2 = 4$ a 8. Para la obtención de estos derivados de aminoazúcar con $n_1 + n_2 = 4$ a 8, es especialmente bien adecuada la cepa SE 50/13 (CBS 614.71).

Si la solución de cultivo contiene suficiente glucosa (aprox. 3,5 % en peso), entonces ya son 0,1 hasta 3 % en peso de fécula suficiente para obtener principalmente mezclas de derivados de aminoazúcar con $n_1 + n_2 = 4$ a 8. Todos estos derivados de aminoazúcar así obtenidos se pueden emplear como com-
5 puestos de partida para la obtención de los homólogos inferiores por vía de la hidrólisis química o enzimática.

Los derivados de aminoazúcar con $n_1 + n_2 = 1$ hasta 4, se obtienen en medida principal si se trabaja en soluciones nu-
10 trientes libres de almidón. Especialmente ventajoso actúa aquí ya la adición de maltosa a la solución nutriente. Así se obtiene, por ejemplo, al agregar maltosa y empleando la cepa SE 50 (CBS 961.70) mezclas de derivados de aminoazúcar con, prin-
15 cipalmente, $n_1 + n_2 = 2$ a 3. La formación de una aminoazúcar con $n_1 = 1$ se logra especialmente empleando como material de partida para el carbono sólo la glucosa. Aquí se ha de tener, sin embargo, en consideración que con un exceso de glucosa con una duración de la fermentación más larga también se forman los derivados de aminoazúcar de peso molecular más alto.

20 Empleando soluciones nutrientes, que no contienen glucosa y como único producto de partida para el carbono se agrega maltosa, entonces se obtiene principalmente el aminoazúcar con $n_1 + n_2 = 2$. En una forma de ejecución industrialmente ventajosa se puede aquí sustituir la maltosa pura por un producto más
25 barato, por ejemplo, maltcina, un extracto de malta natural usual en el mercado.

Para la obtención de los derivados de aminoazúcar, que contienen principalmente aquellos derivados con $n_1 + n_2 = 1$ a 3, ha demostrado ser especialmente adecuada la cepa SE 50/110
30 (CBS 674.73).

Esta cepa da rendimientos en derivados de aminoazúcar de bajo peso molecular, que son aproximadamente dos veces mayores que las obtenidas con la cepa SE 50/13 (CBS 614.71).

5 El cultivo de microorganismos se efectúa por lo general a temperaturas de incubación entre 15 hasta 45°C, preferentemente entre 24 hasta 32°C. Así se obtienen, al emplear las cepas SE 50 (CBS 961.70) ó SE 50/13 (CBS 614.71), derivados de aminoazúcar con $n_1 + n_2 = 4$ a 8 a una temperatura más elevada, por ejemplo, 28°C, mientras a temperaturas más bajas, por ejemplo, 24°C, por ejemplo, las cepas SE 50 (CBS 961.70) y SE 50/110
10 (CBS 674.73) forman en medida principal derivados de aminoazúcar con $n_1 + n_2 = 1$ a 3.

La duración de los cultivos asciende, por lo general, de 1 a 8 días, preferentemente 2 a 6 días. Una mayor duración
15 del cultivo, especialmente en unión con un exceso de un hidrato de carbono en el medio nutriente favorece la formación de derivados de aminoazúcar con valores mayores de $n_1 + n_2$.

El pH del medio de cultivo varía por lo general entre 5,0 hasta 8,5, dándose preferencia a valores pH de 6,0 a 7,0.

20 El punto final de la fermentación se efectúa por lo general por determinación del contenido en actividad inhibidora en el ensayo de inhibición enzimática, así como mediante determinación cromatográfica en capa delgada de la composición del medio de fermentación.

25 En el caso de la hidrólisis química de derivados de aminoazúcar de peso molecular más alto para la obtención de los de peso molecular más bajo, como ya se ha mencionado anteriormente, se procede por lo general tratando los derivados de aminoazúcar de peso molecular más alto con ácidos minerales acuosos
30 1 a 5-normales a temperaturas de 50 a 100°C, especialmente de

90 a 100°C durante 10 a 180 minutos. La hidrólisis enzimática asimismo posible se efectúa por lo general por incubación con enzimas (hidrolasas), especialmente con β -amilasas o α -amilasas no inhibibles o amiloglucosidasas de origen microbial, tal como, por ejemplo, α -amilasas de *B. subtilis*, o por incubación con microorganismos, que sean capaces de crecer en soluciones nutritivas, que contengan los derivados de aminoazúcar de peso molecular más alto en contenidos de un 1 a 10 %, preferentemente un 2 a 5 % como fuente de carbono preferentemente única, por ejemplo, *Aspergillus niger* (ATTC 11.394).

La separación y el aislamiento de los distintos derivados de aminoazúcar según la presente invención parte bien de los caldos de cultivo microbiológicos o de los hidrolizados o bien mezclas de incubación, en las cuales se efectuó la disociación enzimática y/o microbiológica de los derivados de aminoazúcar de peso molecular más alto.

Según los valores para $n_1 + n_2$ se efectúa la elaboración en distinta forma. Así, para la obtención pura de los derivados de aminoazúcar de $n_1 + n_2 = 1$ hasta 4 se procede, por lo general, tratando, en caso dado previa separación del micelo, el correspondiente caldo nutriente o el hidrolizado con carbón activo a un pH neutro, y desorbiendo a continuación los derivados de aminoazúcar ligados al carbón activo mediante tratamiento del carbón activo con alcoholes acuosos o acetona, preferentemente acetona al 50 hasta 80 %. En forma especialmente completa se logra aquí la desorción con valores pH ácidos en la zona de 1,5 hasta 4, preferentemente un pH de 2 a 3.

En caso de que los caldos nutritivos o bien hidrolizados a separar estén teñidos muy oscuros, ha demostrado ser ventajoso tratarlos antes del tratamiento anteriormente descrito

con carbón activo a un pH ácido, primeramente con carbón activo o resinas de absorción, tal como el Lewapol Ca 9221 comercial (granulación 0,35 mm, Bayer AG) a valores pH de 2 a 6, preferentemente 2 a 3 y lograr así una descoloreación. El carbón activo liga aquí en la zona ácida preferentemente sólo los colorantes, pero no los derivados de aminoazúcar.

La separación de los distintos derivados de aminoazúcar de la presente invención del desorbato de carbón activo obtenido como anteriormente descrito, se efectúa entonces, por lo general, conduciendo este desorbato por encima de intercambiadores de cationes fuertemente ácidos, en sí conocidos, tales como, por ejemplo, Dowex 50 W (Firma Dow Chemicals) (pH 1 a 8, preferentemente 2 a 4; con fuerza de iones baja, correspondiente a una conductibilidad de $< 10 \text{ mS.cm}^{-1}$, preferentemente $< 2 \text{ mS.cm}^{-1}$). Los distintos derivados de aminoazúcar se ligan así al intercambiador de cationes. Con especial ventaja se pueden ligar así los derivados de aminoazúcar a partir de solución acetónica (50 hasta 80 % de acetona, pH 1 a 5, preferentemente pH 2 a 4) a tales intercambiadores de cationes.

La desorción selectiva de los derivados de aminoazúcar de la presente invención de estos intercambiadores de cationes se efectúa por lo general empleando ácidos o bases acuosas como agentes de elución, empleándose preferentemente amoníaco o ácido clorhídrico en concentraciones de 0,01 hasta 1 Val/litro.

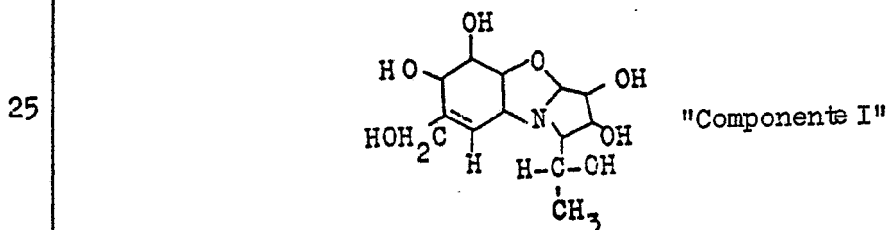
De los distintos desorbatos se obtiene entonces el correspondiente derivado de aminoazúcar después de la neutralización del desorbato con un intercambiador débilmente ácido o bien básico o después de retirar la base o bien ácido mediante extracción en vacío en el caso de bases o ácidos volátiles después de concentrar la solución por liofilización o precipitación con di-

solventes orgánicos, preferentemente con acetona.

Además, es posible separar los derivados de aminoazúcar de bajo peso molecular de los sacáridos inertes por cromatografía en intercambiadores a base de celulosa, preferentemente
5 celulosa fosfórica (Fa. Serva, Heidelberg). Como eluyente se emplean aquí tampones, preferentemente tampones de fosfato, de reducida fuerza iónica, preferentemente 2 a 100 mM, especialmente de 5 a 10 mM, en la zona pH de 2,5 a 8, preferentemente 5 a 6. Condición previa para un fraccionamiento efectivo son aquí
10 contenidos en sal lo más reducidos posible en los preparados a fraccionar, cuyos colorantes molestan menos.

Para la obtención pura de los derivados de aminoazúcar individuales se cromatografían entonces los preparados previamente purificados a través de un tamiz molecular adecuado, por
15 ejemplo, bio-gel-P-2 (Fa. Bio-Rad, München) y las fracciones del eluado se comprueban por cromatografía de capa delgada. Las fracciones, que contienen los compuestos de la presente invención en forma pura, se reúnen, se vuelven a cromatografiar y, finalmente, después de concentrar, se liofiliza o se precipita
20 mediante disolventes orgánicos como arriba descrito.

Todos los derivados de aminoazúcar se caracterizan porque en la hidrólisis total ácida se forma "componente I" $[C_{13}H_{21}O_7N]$, así como glucosa. Para el "componente I" se derivó la siguiente fórmula estructural:



El miembro inicial de los derivados de aminoazúcar

de la presente invención tiene una unidad glucosa. Este compuesto es una sustancia incolora, amorfa, con buena solubilidad en agua, dimetilformamida, sulfóxido dimetílico, metanol y etanol caliente. En la cromatografía de capa delgada empleando éster acético, metanol y agua en una proporción de 10:6:4 presentó el compuesto un valor R_f de 0,46 (maltosa = 0,50 y glucosa = 0,65) en láminas de gel de sílice F 1500 [Schleicher & Schüll] y de 0,47 (maltosa = 0,54 y glucosa = 0,66) en placas de gel de sílice F 254 [Merck, Darmstadt].

Al emplear un reactivo de pulverización de nitrato de plata/hidróxido sódico se obtiene un tinte marrón-negro a temperatura ambiente o después de calentar ligeramente.

El compuesto se sililizó junto con D-glucosa o sacarosa como standards en una mezcla de piridina (1), trimetilclorosilano (0,5) y N-metil-trimetil-silil-trifluoracetamida (1) y, a continuación, se sometió a la cromatografía de gas en una columna de vidrio de 1,8 m, llenada con un 3 % de elastómero de silicona SE 30 [Packard] sobre cromosorb WAW.

La temperatura de inyección y la temperatura detector era de 300°C. La temperatura del horno ascendió a 220°C, y se mantuvo constante hasta la elución de los standards de α - y β -D-glucosa. A continuación se elevó la temperatura a una velocidad de 15°C/minuto hasta llegar a 300°C.

Se empleó un detector de ionización de llama, introduciéndose nitrógeno como gas soporte en una proporción de 40 cc/minuto, aire como gas de combustión en una proporción de 80 cc/minuto e hidrógeno en una proporción de 20 cc/minuto. El compuesto presentó un tiempo de retención de 16 - 17 minutos; (α -D-glucosa = 3 minutos, β -D-glucosa = 4 minutos y sacarosa = 12 - 13 minutos).

Una muestra del compuesto no cristalina, obtenida por concentración de una solución metanólica se disolvió en agua y se determinó el giro óptico específico en $[\alpha]_D = +134,3^\circ$.

5 El espectro RMN en CD_3OD a 220 MHz se muestra en la Figura 1 (abscisa = δ ppm).

Las características predominantes del espectro RMN se muestran en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1

en ppm	Multiplicidad	Intensidad relativa
1,3	Dubleto; $J=6,5$ Hz	3 H
2,3	"Tripletto", J_1 u. J_2 8-10 Hz	1 H
3,15	"Tripletto"; J_1 y J_2 7-9 Hz	1 H
15 3,3 - 3,9	Las señales no se pueden asignar individualmente	12 H
4,13	Sistema AB; $J=12$ Hz	2 H
4,48)	Dubleto; $J=7$ Hz)	1 H
y 5,1)	Dubleto; $J=2,5$ Hz)	
20 4,9	Singlete	11 H Protones intercambiados por deuterium
25 5,0	Dubleto; $J=2-3$ Hz (mal disuelto)	1 H
5,8	Dubleto; $J=3-4$ Hz (mal disuelto)	1 H
		33 H

30 Si este compuesto se hace reaccionar en una mezcla 1:1 de anhídrido acético y piridina a temperatura ambiente, se obtiene un derivado decaacetílico (peso molecular: 903). El espectro RMN del derivado decaacetílico se muestra en la Figura

2.

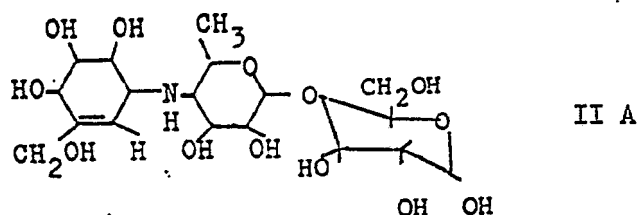
Si la reacción se efectúa en ácido acético glacial/
anhídrido acético 1:1 con cantidades catalíticas de H_2SO_4 , se
puede demostrar por espectroscopia de masa además del derivado
5 decaacetílico también la formación de un derivado undecaacetílico
co (peso molecular: 945).

El espectro de masa del derivado decaacetílico pre-
senta una cresta molecular en 903 (2,5 % de intensidad relati-
va) y una cresta de base en 843. Fragmentos de cresta importan-
10 tes en la zona de masa superior son 844 (55 % de intensidad re-
lativa), 784 (36 % de intensidad relativa), 783 (34 % de inten-
sidad relativa), 759 (34 % de intensidad relativa), 556 (36 %
de intensidad relativa), 496 (37 % de intensidad relativa) y
436 (29 % de intensidad relativa).

15 La metilación con CH_3I/NaH en sulfóxido dimetílico
según Hakomori da como producto principal el derivado decametí-
lico, en cantidad reducida también el derivado undecametílico.

El espectro de masa muestra una cresta molecular en
623 (6,1 % de intensidad relativa) y una cresta de base en 535.
20 Se observa una segunda cresta de molécula en 637 (0,2 % de in-
tensidad relativa).

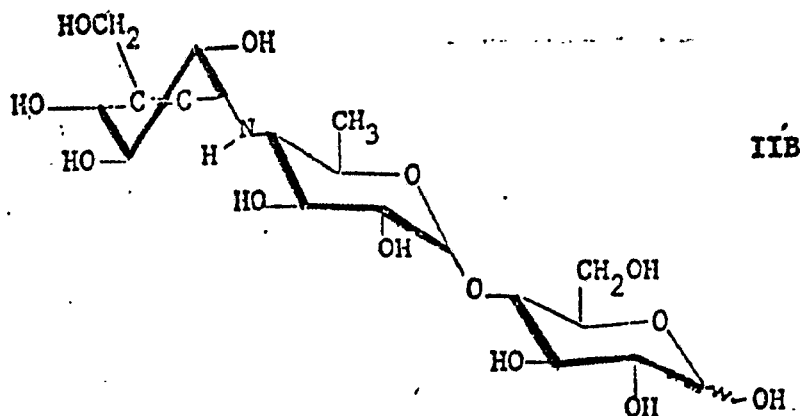
Los datos espectroscópicos y las propiedades químicas
dan la siguiente estructura para este compuesto:



25

En especial, muestra el espectro RMN, que este compues

to IIa tiene la estructura de una O- $\{$ 4,6-bisdesoxi-4- β -S-(1,4,6/5)-4,5,6-trihidroxi-3-hidroximetilciclohex-2-en-1-ilamino $\}$ - α -D-glucopiranosilo $\}$ -(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranososa de la fórmula conformativa:



5

El siguiente miembro de la serie ($n_1 + n_2 = 2$) tiene la composición general $C_{25}H_{43}O_{18}N$ y es un producto amorfo de buena solubilidad en agua. En la cromatografía de capa delgada presenta un valor R_f de 0,35 sobre láminas de gel de sílice F 1500 y 0,33 sobre placas de gel de sílice F 254 empleando el sistema arriba descrito.

10

La rotación óptica en agua $[\alpha]_d$ es $+167,0^\circ$.

El espectro RMN en D_2O a 220 MHz se muestra en la Figura 3 y el espectro RMN ^{13}C la Figura 4.

15

La metilación, como arriba descrito, suministra un compuesto 13 veces metilado, en cantidad más reducida también un producto 14 veces metilado.

20

El espectro de masa del producto de metilación presenta una cresta de molécula en 827 (1,5 % de intensidad relativa) y corresponde a una fórmula de suma $C_{38}H_{69}NO_{18}$.

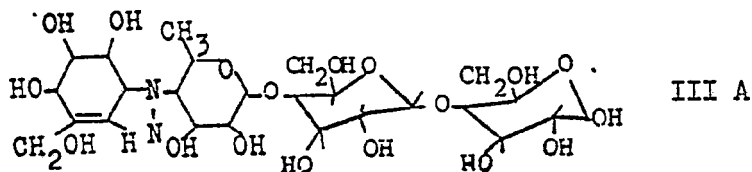
Una segunda cresta molecular con una intensidad rela-

tiva de 0,1 % está presente en 841.

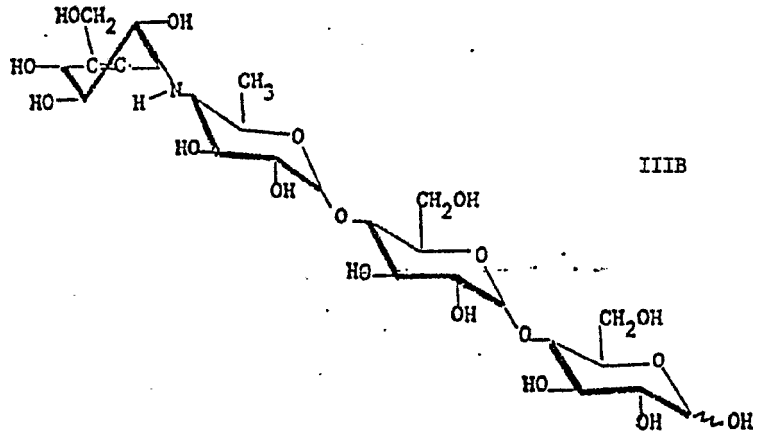
Las crestas de fragmento más importantes son:

	739	(27 % de intensidad relativa)
	592	(3,7 % de intensidad relativa)
5	535	(30 % de intensidad relativa)
	388	(9 % de intensidad relativa)
	386	(13 % de intensidad relativa)
	284	(13 % de intensidad relativa)
	187	(12 % de intensidad relativa)
10	171	(40 % de intensidad relativa)
	101	(34 % de intensidad relativa)
	88	(25 % de intensidad relativa)
	75	Cresta de base.

De las propiedades químicas y espectroscópicas se desprende para este compuesto la siguiente estructura:



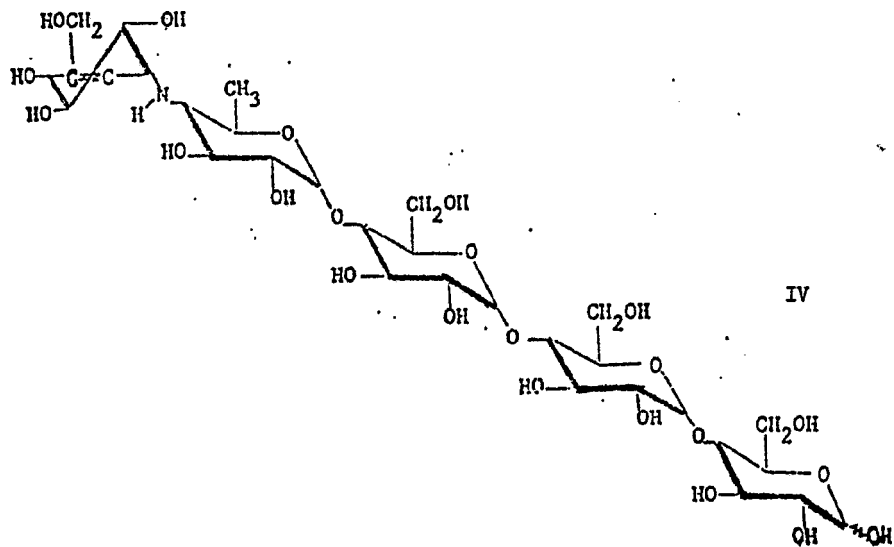
donde a este segundo miembro de la serie de los derivados de aminoazúcar de la presente invención le corresponde la estructura de una 0- { 4,6-bisdesoxi-4- $\sqrt{1}$ S-(1,4,6/5)-4,5,6-trihidroxi-3-hidroximetilciclohex-2-en-1-ilamino } - α -D-glicopiranosil } - (1 \rightarrow 4)-O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranososa de la fórmula conformativa:



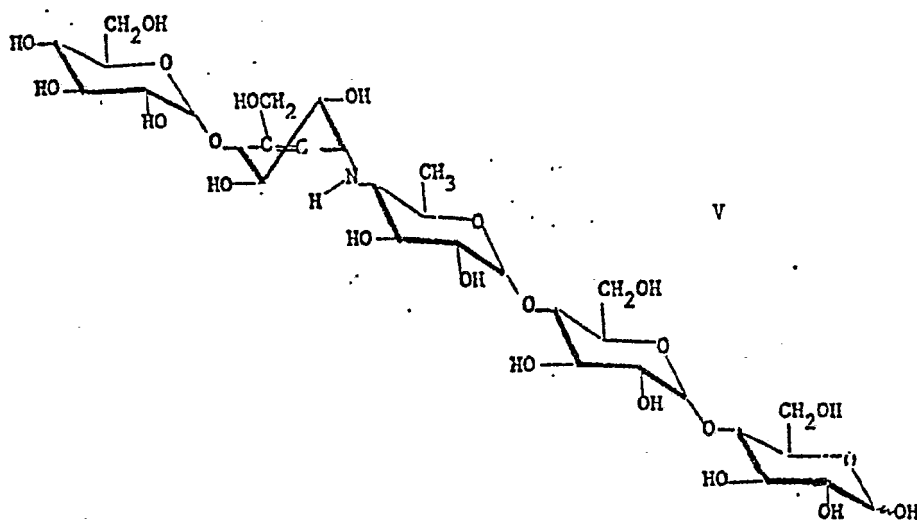
El miembro siguiente a continuación de la serie ($n_1 + n_2 = 3$) se obtiene en dos formas isómeras, formándose predominantemente una de las dos formas isómeras.

5 En la hidrólisis parcial ácida se pueden dissociar ambos compuestos isómeros en el primer miembro de la serie ($n_1 + n_2 = 1$) y glucosa en proporción molar 1:2.

El producto presente en cantidades más pequeñas es el compuesto 0- {4,6-bisdesoxi-4- α -S-(1,4,6/S)-4,5,6-trihidroxi-3-hidroximetilciclohex-2-en-1-ilamino} - α -D-glucopiranosil } - (1 \rightarrow 4) - O - α -D-glucopiranosil - (1 \rightarrow 4) - O - α -D-glucopiranosil - (1 \rightarrow 4) - D-glicopiranososa de la fórmula conformativa:



El producto isómero presente en mayores cantidades es el compuesto 0- { 4,6-bisdesoxi-4- β -S-(1,4,6/5)-4,5,6-trihidroxi-3-hidroximetil-4-O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-ciclohex-2-en-1-ilamino β - α -D-glicopiranosil } -(1 \rightarrow 4)-O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranososa de la fórmula conformativa:

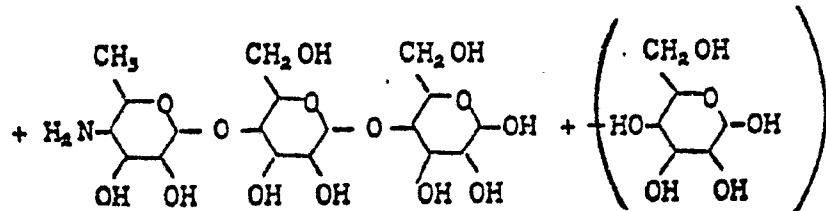
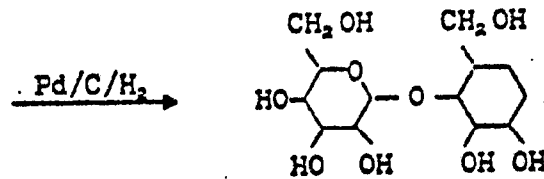
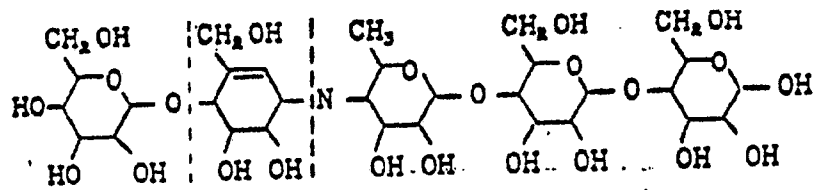


Estos isómeros muestran en placas F 1500 empleando n-butanol, etanol y agua en proporción de 50:30:20 valores $R_{glucosa}$ de 0,41 a 0,46. La presencia de los isómeros con la estructura mostrada en la fórmula V se puede demostrar analizando los productos obtenidos de la degradación hidrogenante (paldio/carbón activo). A estos productos de degradación pertenecen:

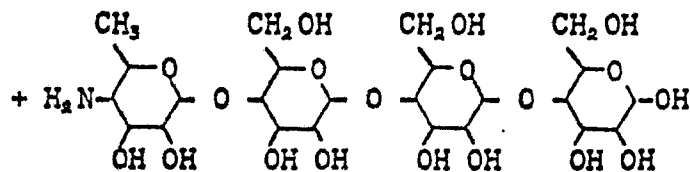
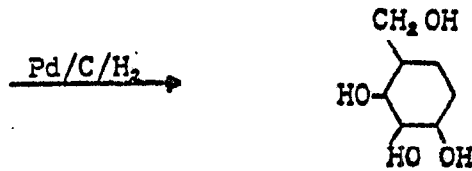
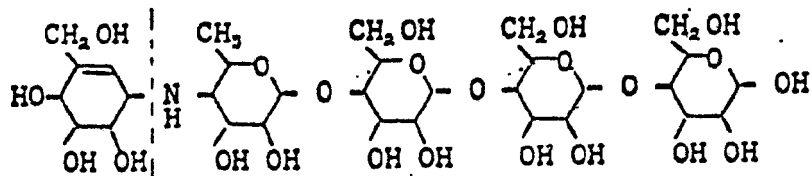
3-hidroximetil-4,5,6-trihidroxi- β -4-O- α -D-glucopiranosil-(1)-ciclohexan, 0-(4-amino-4,6-bisdesoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranososa y glucosa.

Como en esta degradación se disocia el enlace C-N en la posición alquilo y la hidrogenación se hidrogena, está claro que este compuesto, que es isómero con respecto al compuesto de fórmula IV, está estructuralmente relacionado con el compuesto de fórmula IIIA ó III B; sin embargo, está caracterizado

por la presencia de un ulterior grupo glucopiranosilo en la posición 4 del anillo ciclohexeno.



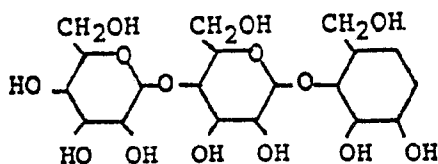
5 La presencia del isómero con la estructura indicada en la fórmula IV se demuestra por la formación de validatol y O-(4-amino-4,6-bisdesoxi- α -D-glucopiranosil)-(1 \rightarrow 4)-O- α -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 4)-O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranososa.



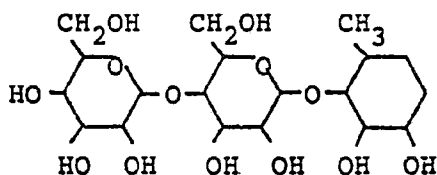
En ulteriores investigaciones se metilaron los isómeros con $n_1 + n_2 = 3$ según métodos conocidos, se hidrolizaron, se redujeron con borohidruro sódico, se acetilaron y analizaron por cromatografía de gas. Mientras el compuesto de fórmula IV sólo da 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol, suministra el compuesto de fórmula V el 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol y el 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol en proporción molar de 2 : 1. Los isómeros con $n_1 + n_2 = 3$ de las fórmulas IV y V no se degradan por la β -amilasa.

Los compuestos isómeros con las fórmulas IV y V se separaron cromatográficamente en una resina intercambiadora ácida con ácido clorhídrico 0,025 n como eluyente.

El producto con $n_1 + n_2 = 4$ se hidrogenó en contacto Pd/C. Los productos de hidrogenólisis no básicos se separaron a través de un intercambiador de iones ácido y se separaron por cromatografía preparativa de capa delgada. Después de la acetilación se identificaron los dos siguientes pseudotrisacáridos por espectrometría de masa como productos de disociación principales:



(como decaacetato con la cresta molecular en $m/e = 906$)



(como nonaacetato con la cresta molecular en $m/e = 848$).

5 Con un componente principal ampliamente predominante del componente 5 es, por lo tanto, el isómero de la fórmula conformativa VI con una unidad de maltosa ligada glicosídicamente al resto ciclitol.

Esta estructura se desprende también como resultado de la disociación con β -amilasa, en la que la parte principal del componente con $n_1 + n_2 = 4$, se degrada al compuesto de fórmula III B y maltosa.

10 El componente con $n_1 + n_2 = 5$ se comporta en la degradación por β -amilasa como sigue:

15 Aproximadamente un 90 % se degrada a un compuesto de fórmula V y a una cantidad correspondiente de maltosa, de esto se desprende que el isómero con una unidad de maltotriosa ligada glicosídicamente al resto ciclitol es componente principal del producto; aproximadamente un 10 % no se degrada por la amilasa.

20 Los miembros más elevados de la serie, que contienen 4 a 8 unidades de glucosa con pesos moleculares de 969 hasta 1617 inhiben menos la sacarasa.

La cromatografía de capa delgada empleando n-butanol, etanol, agua, en proporción 50:30:20 sobre placas de gel de sílice F 1500, da valores de $R_{glucosa}$ de

25 0,30 - 0,34 4 unidades de glucosa);
0,21 - 0,23 5 unidades de glucosa);
0,14 - 0,16 6 unidades de glucosa); y
0,09 - 0,11 7 unidades de glucosa).

Como en los miembros inferiores de esta serie, da la hidrólisis ácida total "componente I" y glucosa en proporciones

moleculares discretas, esto es, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7 y 1:8 (siendo las proporciones de glucosa de un 74,4 %, 79,7 %, 83,3 %, 86,5 % ó bien 89,1 %).

5 En la cromatografía de capa delgada empleando placas de gel de sílice F 1500 con n-butanol, etanol, agua, en proporción 45 : 35 : 20 como disolvente, se aprecian los siguientes valores R_f en el revelado triple:

	Proporción Glucosa: Componente I	Standard	Valor R_f
10		Glucosa	0,77
		Maltosa	0,65
		Maltotriosa	0,51
		Maltotetraosa	0,39
		Maltopentaosa	0,27
15	4:1		0,25
		Maltohexaosa	0,21
	5:1		0,18
		Maltcheptaosa	0,15
	6:1		0,13
20		Maltooctaosa	0,11
	7:1		0,09
	8:1		0,07

25 Asimismo muestra la hidrogenación catalítica arriba descrita que algunas, pero no todas las unidades de glucosa de estos miembros superiores están enlazados en la posición 4 del

grupo ciclohexeno.

Como estos compuestos contienen cadenas lineales de oligoglucósido con $1 \rightarrow 4$ enlaces, se pueden emplear como sustratos para ciertas enzimas disociadoras de carbohidrato. El margen
5 de las enzimas está evidentemente limitado a aquéllas que no son inhibidas esencialmente por los compuestos.

Las α -amilasas bacteriales y fungosas se pueden emplear para la degradación de cualquier cadena de oligoglucósido, que contenga 3 ó más unidades glucosa y de compuestos de bajo
10 peso molecular y fragmentos de sacárido inertes, tales como, por ejemplo, maltosa y maltotriosa. Este procedimiento de degradación se puede emplear en los compuestos con $n_1 + n_2 \geq 3$ y representa una ulterior demostración para el enlace α , $1 \rightarrow 4$. Los compuestos según la presente invención con 4 a 7 unidades
15 de glucosa se pueden degradar también parcialmente por β -amilasa. Como la β -amilasa disocia las unidades de maltosa del extremo no reducido de una cadena de glucosa con α , $1 \rightarrow 4$ enlaces, suministra un análisis esmerado de los productos de degradación de la β -amilasa valiosa información sobre cada sustituyente de oligoglucósido enlazado en la posición 4 del anillo
20 ciclohexeno, especialmente sobre su longitud de cadena y el número de las glucosas en la cadena enlazada a las bisdesoxiglucosa, es decir, en el extremo reductor del compuesto. Los com-
25 puestos, que contienen 4, 5, 6, 7 ú 8 unidades de glucosa, no se pueden, sin embargo, degradar totalmente por β -amilasa. La resistencia de una parte de los compuestos se debe evidentemente a condiciones estructurales insuficientes para el ataque de la β -amilasa.

Los resultados de la degradación de la β -amilasa
30 se puede resumir como sigue:

	Número de unidades de glucosa en el producto de partida	Número de unidades de glucosa en los productos de degradación	Unidades de maltosa retiradas
5	4	4 2	0 1
	5	5 3	0 1
10	6	6 4 2	0 1 2
	7	7 5 3	0 1 2
15	8	8 6 4 2	0 1 2 3

20 En caso dado, se recupera una parte del producto de partida.

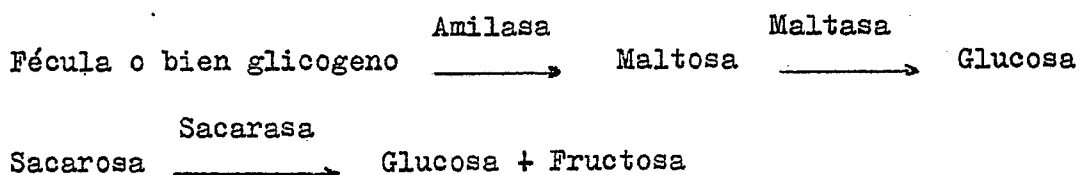
25 Respecto a la degradación β -amilolítica se ha de acen-
 tuar nuevamente que la β -amilasa sólo es capaz de retirar uni-
 dades de maltosa, y éstas, además, sólo del extremo no reductor
 de un oligosacárido. Se ha de evitar que cualquier teoría conduz-
 ca a una limitación. A pesar de que la estructura exacta de es-
 30 tos compuestos superiores no está totalmente aclarada, de los
 hallazgos arriba mencionados, se puede llegar a la conclusión
 que los compuestos que tienen 4, 5, 6, 7 y 8 unidades de glucosa
 comprenden los derivados de los compuestos inferiores con la
 fórmula III A, que contienen cadenas con 2, 3, 4, 5 y 6 unida-
 des de glucosa, que tienen α , 1 \rightarrow 4 enlaces entre sí, estando

la cadena del oligosacárido enlazado en la conformación α con la posición 4 del anillo ciclohexeno.

5 La metilación de los compuestos con ioduro metílico/hidruro sódico en sulfóxido dimetílico, hidrólisis total, formación de un derivado y ulterior análisis por cromatografía de gas, da el derivado de 2,3,6-trimetilglucosa, de manera que las unidades de glucosa están forzosamente enlazadas 1-4 en una estructura exclusivamente lineal.

10 Un segundo producto de metilación, que, en dependencia del compuesto metilado, puede estar presente en distinto grado o bajo circunstancias inexistente, es el derivado 2,3,4,6-tetrametilo. La presencia de este derivado y su proporción molar al derivado trimetílico depende de los sustituyentes enlazados al anillo ciclohexeno.

15 Es sabido que en los animales y seres humanos, después de la toma de alimentos y bebidas, que contienen carbohidratos (por ejemplo, fécula de trigo, fécula de patata, fruta, zumo de fruta, cerveza, chocolate), se presentan hiperglicemias, que, debido a una rápida degradación de los carbohidratos se producen por hidrolasas de glicósido (por ejemplo, amilasas de saliva y 20 páncreas, maltasas, sacarosas) según el siguiente esquema:



25 Estas hiperglicemias son especialmente fuertes y de larga duración en los diabéticos. En los adiposos produce la hiperglicemia alimentaria frecuentemente una secreción especialmente fuerte de insulina, lo que, a su vez, conduce a un incremento de la formación de grasa y a un reducido lipocatabolismo. En las per-

sonas con un metabolismo sano y en las personas adiposas las hiperglicemias de este tipo son frecuentemente seguidas de una hipoglicemia como resultado de la segregación de insulina. Es sabido que tanto las hipoglicemias, como también la pasta de comida, que queda en el estómago, fomenta la producción de jugos gástricos, lo que, a su vez, inicia o fomenta la formación de una gastritis, de un Ulcus ventriculi o duodeni.

Se ha descubierto ahora que los derivados de aminoazúcar de la presente invención reducen considerablemente la hiperglicemia alimentaria, la hiperinsulinemia y la hipoglemia, especialmente también la hipoglicemia postprandial reactiva.

Además es sabido que en la cavidad bucal se disocian los carbohidratos, especialmente la sacarosa, por los microorganismos, y de esta manera se fomenta la formación de caries.

Los derivados de aminoazúcar de la presente invención se pueden emplear para evitar o bien reducir una formación tal de caries.

Ensayo de amilasa in vitro

Una unidad de inhibidor de amilasa (1 AIE) está definida como la cantidad de inhibidor, que inhibe dos unidades de amilasa en un 50 %. Una unidad de amilasa (AE) es la cantidad de enzima, que en un minuto bajo las condiciones de ensayo más abajo indicadas disocia 1 μ equivalente de enlaces glucósidos en la fécula. Los μ Val de enlaces disociados se determinan colorimétricamente como μ Val de azúcar reductora formada con ácido dinitrosalicílico y con ayuda de una curva standard de maltosa se indica como μ Val de equivalentes de maltosa. Para la realización del ensayo se mezclan 0,1 cc de solución de amilasa (20 - 22 AE/cc) con 0 - 10 μ g de inhibidor ó 0 - 20 μ l de la solución a comprobar en 0,4 cc de tampón de glicerofosfato sódico 0,02 m/

0,001 m de CaCl_2 , pH 6,9, y se equilibra durante unos 10 - 20 minutos en un baño maría de 35°C . Después se incuba durante 5 minutos con 0,5 cc de una solución de fécula al 1 % previamente calentada a 35°C (fécula, soluble, de la firma Merck, Darmstadt, n° 1252) a 35°C y a continuación se mezcla con 1 cc de reactivo de ácido dinitrosalicílico (según P. Bernfeld en Colowick-Kaplan Meth. Enzymol., tomo 1, página 149). Para el revelado del color se calienta el preparado durante 5 minutos en el baño maría hirviendo, después se enfría y se mezcla con 10 cc de agua destilada. La extinción a 540 nm se mide contra un valor en vacío correspondientemente preparado sin amilasa. Para la evaluación se lee la actividad de amilasa, que aún es efectiva después de la adición de inhibidor de una curva standard de amilasis, que ha sido previamente registrada y de este valor se calcula el porcentaje de la inhibición de la amilasa empleada. El porcentaje de la inhibición se registra como función del cociente

$$\frac{\mu\text{g de inhibidor} \dagger}{\text{AE} \ddagger}$$

AE ††

† referido a la sustancia seca

‡‡ AE en el preparado no inhibido de la misma serie se lee en la curva el punto de inhibición del 50 % y se transforma en AIE/mg de inhibidor.

Ensayo de sacarasa in vitro

Una unidad de inhibidor de sacarasa (SIE) se define como la cantidad de inhibidor, que inhibe dos unidades de sacarasa en un 50 %. Una unidad de sacarasa (SE) es la cantidad de enzima, que en un minuto, bajo las condiciones de ensayo más abajo indicadas, disocia 1 μmol de sacarosa a glucosa y fructosa. Los μmoles de glucosa formada se determinan cuantitativamente

con ayuda de la reacción de glucosidasa bajo condiciones, en las cuales ya no se presenta una ulterior disociación de sacarosa por la sacarasa. Para la realización del ensayo se mezclan 0,05 cc de una solución de sacarasa ajustada a 0,12 SE [Sacarasa solubilizada de mucosa del intestino delgado porcino según B. Borgström, A. Dahlquist, Acta Chem. Scand. 12, (1958), página 1997. Diluido con 0,1 m de tampón de maleinato de sodio, pH 6,0, a un contenido en SE correspondiente], con 0 - 20 µg de inhibidor ó 0 - 20 µl de la solución a comprobar y se completa a 0,1 cc con 0,1 m de tampón de maleinato sódico, pH 6,0. Se equilibra durante 10 minutos a 35°C y después se mezcla con 0,1 cc de una solución de sacarosa 0,05 m previamente calentada a 35°C en tampón de maleinato sódico 0,1 m, pH 6,0. Se incuba durante 20 minutos a 35°C y la reacción de sacarasa se para mediante adición de 1 cc de reactivo de glucosidasa [el reactivo de glucosidasa se prepara por disolución de 2 mg de glucosidasa (Fa. Boehringer, grado de pureza I) en 100 cc de tampón tris-HCl 0,565 m, pH 7,0, y adición a continuación de 1 cc de solución de detergente (2 g de triton X 100 + 8 g 95 % de etanol p.a.), 1 cc de solución de dianisidina (260 mg de o-dianisidina . 2 HCl en 20 cc de H₂O) y 0,5 cc de solución acuosa al 0,1 % de peroxidasa (Firma Boehringer; liofilizado, grado de pureza II)] y se incuba durante otros 30 minutos a 35°C. Después se agrega 1 cc de H₂SO₄ al 50 % y con 545 nm se mide con respecto a un valor de vacío correspondiente. Para la evaluación se calcula el porcentaje de la inhibición de la sacarasa empleada y del punto de inhibición al 50 % se transforma con ayuda de una curva standard de glucosa en SIE/g ó bien SIE/litro.

Ensayo de maltasa

Una unidad inhibidora de maltasa (MIE) se define como la cantidad de inhibidor que inhibe dos unidades de maltasa en un 50 %. Una unidad de maltasa (ME) es la cantidad de enzima, que en un minuto bajo las condiciones de ensayo indicadas más abajo disocia 1 μ mol de maltosa en 2 μ moles de glucosa. Los μ moles de glucosa formados se determinan cuantitativamente con ayuda de la reacción de glucoseoxidasa bajo las condiciones, en las que ya no se presenta ninguna disociación de matosa por la maltasa. Para la realización del ensayo se mezclan 0,05 cc de una solución de maltasa ajustada a 0,060 - 0,070 ME \bar{m} altasa solubilizada de mucosa del intestino delgado porcino según B. Borgström, A. Dahlquist, Acta Chem. Scand. 12 (1958), página 1997. Diluido con tampón de maleinato sódico 0,1 m, pH 6,0, a un contenido en ME correspondiente con 0 - 20 μ g de inhibidor ó 0 - 20 μ l de la solución a comprobar y con tampón de maleinato sódico 0,1 m, pH 6,0, se completa a 0,1 cc. Se equilibra durante 10 minutos a 35°C y después se mezcla con 0,1 cc de una solución de maltosa 0,05 m previamente calentada a 35°C en tampón de maleinato sódico 0,1 m, pH 6,0. Se incuba durante 20 minutos a 35°C y la reacción de maltasa se para por adición de 1 cc de reactivo de glucoseoxidasa \bar{p} reparación del reactivo de glucoseoxidasa: como descrito en el ensayo de la sacarasa y se sigue incubando durante otros 30 minutos a 35°C. Después se agrega 1 cc de H₂SO₄ al 50 % y a 545 nm se mide con respecto a un valor en vacío correspondiente.

Para la evaluación se calcula el porcentaje de la inhibición de la maltasa empleada y del punto de inhibición del 50 % se transforma con ayuda de una curva standard de glucosa a MIE/g ó bien MIE/litro.

Los resultados del ensayo inhibidor de las enzimas in vitro para los distintos derivados de aminoazúcar de la presente invención se han resumido en la tabla II a continuación:

Tabla II

5	Fórmula	Número de unidades de glucosa	Inhibición de α -amilasa AIE/g	Inhibición de sacarosa SIE/g	Inhibición de maltasa MIE/g
10	II B	1	300.000	30.000	5.000
	III B	2	300.000	68.000	15.000
	V	3	1.400.000	21.000	5.000
		4 - 6	17.500.000	8.500	-
		5 - 7	30.000.000	2.500	-

15 Como se desprende de la tabla, aumenta la actividad inhibidora específica in vitro con respecto a la α -amilasa del páncreas fuertemente según aumenta el peso molecular de la serie; así presentan los compuestos con 5 - 7 unidades de glucosa una inhibición enzimática in vitro 100 veces más fuerte que el compuesto con 1 ó 2 unidades. La inhibición de sacarasa está 20 más fuertemente destacada en el derivado con 2 unidades, el derivado con una unidad de glucosa inhibe, sin embargo, sólo la mitad de fuerte, y el miembro más elevado presenta una actividad específica más decayente de la inhibición de la sacarasa.

25 In vivo, transcurre la eficacia de la inhibición de sacarasa aproximadamente paralelo con la actividad inhibidora específica hallada in vitro. Por el contrario, se ha hallado sorprendentemente en el ensayo de carga de fécula in vivo para los compuestos con 1, 2 ó 3 unidades de glucosa una eficacia incre-

mentada en 10 - 40 veces con respecto a la inhibición de la amilasa in vitro.

Para producir una hiperglicemia alimentaria e hiperinsulemia se aplicaron a grupos de, en cada caso, 6 ratas en ayunas

- a) 2,5 g de sacarosa,
- b) 2,5 g de maltosa o
- c) 1 g de fécula hervida

p.os en solución acuosa o como suspensión. Otras 6 ratas reciben los mencionados carbohidratos en la misma cantidad y, adicionalmente, un inhibidor de hidrolasa de glucósido en la dosificación indicada.

Además, otras 6 ratas reciben una cantidad correspondiente de solución salina.

La glucosa de la sangre y la insulina del suero se miden en períodos breves en la sangre del plexo venoso retroorbital. Las determinaciones de la glucosa de la sangre se efectúan en el autoanalizador (Technicon[®] según Hoffman: J.biol.Chem. 120, 51 (1937) o enzimáticamente con glucoseoxidasa o hidrocloreuro de o-dianisidina), las determinaciones de insulina del suero según el método de Hales y Randle: Biochem. J. 88, 137 (1963)).

Los resultados de la inhibición de sacarasa in vivo (administración de sacarosa) en la rata en ayunas se reflejan en la tabla III a continuación:

Tabla III

Fórmula	n	Dosis (SIE)	Glucosa de la sangre en mg % (Valor medio \pm desviación)			
			15 Min.	30 Min.	45 Min.	60 Min.
IIB	1	Solución salina	69 \pm 5.2	84 \pm 3.9	91 \pm 5.9	-
		Sacarosa (Control)	117 \pm 11	135 \pm 8.1	152 \pm 18	-
		Sacarosa + 50 SIE	105 \pm 11	123 \pm 5.2*	128 \pm 11*	-
		Sacarosa + 100 SIE	89 \pm 6.5***	111 \pm 4.1***	116 \pm 3.9***	-
		Sacarosa + 200 SIE	72 \pm 4.6***	95 \pm 9.1***	104 \pm 9.6***	-
IIBB	2	Solución salina	55 \pm 4.5	92 \pm 8.5	95 \pm 6.4	-
		Sacarosa (Control)	113 \pm 9.9	126 \pm 20	127 \pm 14	-
		Sacarosa + 25 SIE	71 \pm 3.7***	100 \pm 7.3*	107 \pm 2.4**	-
		Sacarosa + 100 SIE	58 \pm 5.9***	92 \pm 4.0**	98 \pm 5.0***	-
V	3	Solución salina	66 \pm 4.6	73 \pm 4.3	76 \pm 3.9	-
		Sacarosa (Control)	122 \pm 6.6	125 \pm 16.0	128 \pm 14.8	-
		Sacarosa + 25 SIE	88 \pm 11.4 **	101 \pm 12.0 *	104 \pm 7.4 **	-
		Sacarosa + 50 SIE	91 \pm 9.4 **	105 \pm 7.0 *	94 \pm 9.0 ***	-
		Sacarosa + 100 SIE	81 \pm 7.2 **	90 \pm 8.0 ***	97 \pm 1.6 ***	-
-	4-6	Solución salina	58 \pm 2.9	49 \pm 3.3	54 \pm 4.8	63 \pm 5.0
		Sacarosa (Control)	107 \pm 11	121 \pm 6.0	132 \pm 16	132 \pm 6.7
		Sacarosa + 25 SIE	109 \pm 6.4	105 \pm 10**	112 \pm 9.1*	108 \pm 8.1***
		Sacarosa + 50 SIE	103 \pm 4.1	107 \pm 15	102 \pm 7.7**	101 \pm 9.2***
		Sacarosa + 100 SIE	85 \pm 8.1**	94 \pm 9.9***	95 \pm 3.5***	85 \pm 6.4***
-	5-7	Solución salina	58 \pm 2.9	49 \pm 3.3	54 \pm 4.8	63 \pm 5.0
		Sacarosa (Control)	107 \pm 11	121 \pm 6.0	132 \pm 16	132 \pm 6.7
		Sacarosa + 75 SIE	102 \pm 11	108 \pm 9.6*	109 \pm 7.5**	101 \pm 7.9**
		Sacarosa + 150 SIE	92 \pm 7.0*	100 \pm 8.3***	109 \pm 3.7**	102 \pm 6.3***
		Sacarosa + 300 SIE	95 \pm 8.1*	84 \pm 8.7***	93 \pm 9.0***	91 \pm 4.5***

* = Probabilidad comparada con el control con sacarosa = <0,05
 ** = Probabilidad comparada con el control con sacarosa = <0,01
 *** = Probabilidad comparada con el control con sacarosa = <0,001

Como se aprecia de los datos de arriba transcurre la actividad in vivo en la inhibición de sacarasa paralela a la actividad inhibidora hallada in vitro. Así aumenta el ED₅₀, mientras disminuyen las unidades de inhibición de sacarasa por mg. Los resultados se han resumido en la siguiente tabla IV:

Tabla IV

Fórmula	Unidades de glucosa	Inhibición de sacarasa	
		<u>in vitro</u> SIE/mg	<u>in vivo</u> (ED ₅₀ mg/kg)
IIB	(1)	30	3,0
IIIB	(2)	68	0,21
V	(3)	21	2,65
-	(4-6)	8,5	~ 15,30
-	(5-7)	2,5	~ 52,00

Sorprendentemente es la inhibición in vivo de la disociación de fécula por los compuestos de fórmula IIB, IIIB y V, mucho más alta a lo que se esperaba a base de los datos hallados in vitro para la inhibición de amilasa y, por lo tanto, no corresponde a la muestra esperada. La tabla V a continuación da los datos determinados como arriba in vivo para la rata en ayunas después de administrar la fécula:

Tabla V

Fór- mula	Unida- dos de gluco- sa	Dosis (AIE)	Glucosa de la sangre en mg. % (Valor medio \pm desviación)					
			5 Min.	10 Min.	15 Min.	20 Min.	30 Min.	45 Min.
IIB	1	Solución salina	74 \pm 6.2	74 \pm 3.0	82 \pm 9.4	71 \pm 11	76 \pm 5.4	90 \pm 9.2
		Fécula (Control)	101 \pm 8.8	135 \pm 13	146 \pm 4.8	151 \pm 9.5	148 \pm 18	156 \pm 19
		Fécula + 75 AIE	102 \pm 2.9	130 \pm 6.9	128 \pm 5.4***	143 \pm 11	125 \pm 11*	132 \pm 18*
		Fécula + 150 AIE	98 \pm 8.7	116 \pm 9.0*	128 \pm 5.8***	127 \pm 4.8***	115 \pm 5.2**	137 \pm 5.2**
		Fécula + 300 AIE	87 \pm 13	106 \pm 1.8***	110 \pm 8.9***	111 \pm 2.1***	108 \pm 5.3*	121 \pm 7.2*
IIBB	2	Solución salina	61 \pm 3.7	68 \pm 3.9	83 \pm 5.3	75 \pm 8.7	91 \pm 5.2	84 \pm 1.5
		Fécula (Control)	85 \pm 7.9	120 \pm 7.7	132 \pm 11	140 \pm 12	135 \pm 5.0	128 \pm 14
		Fécula + 150 AIE	82 \pm 7.5	105 \pm 4.2**	120 \pm 6.0*	124 \pm 7.0*	134 \pm 6.1	125 \pm 5.2
		Fécula + 300 AIE	79 \pm 8.2	97 \pm 2.7***	105 \pm 10**	118 \pm 6.7**	119 \pm 9.9**	130 \pm 5.9
		Fécula + 600 AIE	70 \pm 4.6**	80 \pm 8.8***	94 \pm 6.9***	91 \pm 16***	103 \pm 9.2***	102 \pm 4.2***
		Fécula + 1,200 AIE	70 \pm 7.0**	84 \pm 7.7***	88 \pm 7.4***	97 \pm 5.2***	97 \pm 5.0***	100 \pm 4.3***
V	3	Solución salina	52 \pm 2.3	75 \pm 7.9	57 \pm 3.7	78 \pm 9.6	82 \pm 6.5	70 \pm 6.9
		Fécula (Control)	93 \pm 7.3	133 \pm 12	127 \pm 9.3	152 \pm 15	156 \pm 15	124 \pm 7.7
		Fécula + 750 AIE	86 \pm 8.5	107 \pm 5.0***	117 \pm 8.7*	121 \pm 12**	126 \pm 11***	114 \pm 3.6***
		Fécula + 1,500 AIE	77 \pm 14*	92 \pm 9.6***	94 \pm 9.5***	113 \pm 9.7***	112 \pm 8.8***	111 \pm 4.2**
		Fécula + 3,000 AIE	65 \pm 5.6***	101 \pm 3.3***	82 \pm 11***	112 \pm 4.5***	109 \pm 6.4***	104 \pm 2.5***
-	4-6	Solución salina	-	55 \pm 4.8	63 \pm 5.9	67 \pm 5.8	72 \pm 4.7	66 \pm 5.0
		Fécula (Control)	-	103 \pm 11	117 \pm 8.6	118 \pm 8.5	128 \pm 8.9	109 \pm 11
		Fécula + 6,000 AIE	-	99 \pm 4.5	118 \pm 5.8	104 \pm 8.1*	123 \pm 11	107 \pm 7.3
		Fécula + 12,000 AIE	-	90 \pm 5.2*	98 \pm 8.2**	99 \pm 4.1***	117 \pm 6.7*	104 \pm 8.2
		Fécula + 24,000 AIE	-	74 \pm 5.5***	82 \pm 2.9***	83 \pm 3.7***	96 \pm 6.6***	85 \pm 6.4**
-	5-7	Solución salina	-	55 \pm 4.8	63 \pm 5.9	67 \pm 5.8	72 \pm 4.7	66 \pm 5.0
		Fécula (Control)	-	103 \pm 11	117 \pm 8.6	118 \pm 8.5	128 \pm 8.9	109 \pm 11
		Fécula + 6,000 AIE	-	95 \pm 4.3	107 \pm 3.3*	102 \pm 5.5**	111 \pm 3.0**	102 \pm 6.7
		Fécula + 12,000 AIE	-	87 \pm 8.6*	94 \pm 8.8**	89 \pm 8.5***	98 \pm 8.3***	91 \pm 4.3**
		Fécula + 24,000 AIE	-	74 \pm 8.9***	84 \pm 7.2***	84 \pm 6.9***	85 \pm 6.5***	85 \pm 4.9**

* = Probabilidad comparada con el control con fécula = <0.05
 ** = Probabilidad comparada con el control con fécula = <0.01
 *** = Probabilidad comparada con el control con fécula = <0.001

De los datos de arriba se desprende que mientras el grado de la inhibición de sacarasa, tanto in vitro, como también in vivo demuestra ser una clara función del peso molecular, la inhibición de amilasa sólo in vitro es dependiente del peso molecular, mientras in vivo la inhibición de la disociación de la fécula no disminuye según disminuye el peso molecular, sino que, sorprendentemente, se mantiene constante. A pesar de que la actividad inhibidora de amilasa in vivo disminuye con el peso molecular, los valores ED₅₀ de la inhibición de la digestión de fécula es esencialmente igual para todos los compuestos de la presente invención. Esto se ha resumido en la siguiente tabla VI:

Tabla VI

Fórmula	Unidades de glucosa	Inhibición de α-amilasa	Inhibición de la digestión de fécula
		<u>in vitro</u> AIE/mg	<u>in vivo</u> (ED ₅₀ mg/kg)
IIB	(1)	300	0,76
IIIB	(2)	300	1,60
V	(3)	1.400	1,61
-	(4-6)	17.500	1,42
-	(5-7)	30.000	1,00

Por lo tanto, es sorprendentemente posible lograr con los compuestos IIB, IIIB y V simultáneamente una inhibición de la digestión de sacarosa y fécula, y esto con una dosis precisa, previsible y característica.

Los compuestos poseen, además, un ventajoso efecto

con respecto a la absorción de glucosa. Esto se aprecia de los siguientes datos en la tabla VII (experimentos con ratas hambrientas) para el compuesto de fórmula IIIB ($n_1 = 2$).

Tabla VII

5	Dosis	Glucosa de la sangre en mg % (valor medio \pm desviación)		
		15 min.	30 min.	45 min.
	Solución salina	72 \pm 4,6	78 \pm 1,3	87 \pm 6,8
	Glucosa (control)	142 \pm 12	142 \pm 12	158 \pm 19
10	Glucosa + 30 mg	135 \pm 13	128 \pm 5,5	132 \pm 7,3
	Glucosa + 60 mg	125 \pm 13	118 \pm 2,9**	130 \pm 9,0***

** Probabilidad comparada con el control con glucosa = 0,05

*** Probabilidad comparada con el control con glucosa = 0,01

15 La purificación de la mezcla de los miembros más altos de esta serie y la aplicación en forma pura, conduce inesperadamente a una actividad y especificidad aún mayor. Esto se puede demostrar mediante una comparación de los datos de inhibición in vitro de la α -amilasa y sacarasa indicados en la tabla II con los datos para los compuestos puros indicados en la tabla

20 VIII a continuación:

Tabla VIII

Número de unidades de glucosa	Inhibición de α -amilasa AIE/g	Inhibición de sacarasa SIE/g
4	67.000.000	7.000
5	57.000.000	3.500
6	42.000.000	1.200
7	24.000.000	60
8	5.000.000	10

5 Los resultados anteriores muestran la alta actividad del compuesto de 4 unidades de glucosa en el papel de un inhibidor de α -amilasa. También los compuestos con 5 y 6 unidades muestran una actividad inhibidora específica considerablemente superior a la hallada en los preparados hasta ahora conocidos.

15 Una disminución de la actividad inhibidora se presenta según aumenta el peso molecular, tal y como se puede apreciar en los compuestos con 7 y 8 unidades de glucosa, a pesar de que éstos aún presentan considerable actividad inhibidora. En la inhibición

20 de sacarasa in vitro parece estar en dependencia inversa del peso molecular. El compuesto con 4 unidades de glucosa presenta aproximadamente 1/10 de actividad específica que el compuesto con 2 unidades de glucosa, mientras la actividad inhibidora del compuestos con 8 unidades de glucosa es sólo reducida.

25 Los compuestos se pueden aplicar sin diluir, por ejemplo, como polvos o en una cápsula de gelatina o en combinación con un excipiente en una composición farmacéutica.

 Los preparados farmacéuticos pueden contener una cantidad mayor o más pequeña del inhibidor, por ejemplo, 0,1 % hasta 99,5 %, en combinación con un excipiente inerte, no tóxi-

co, farmacéuticamente compatible, pudiendo contener el excipiente uno o varios diluyentes sólidos, semisólidos o líquidos, materiales de carga y/o agente auxiliar de formulización no tóxico, inerte y farmacéuticamente compatible. Tales preparados farmacéuticos se presentarán preferentemente en forma de unidades de dosificación, es decir, unidades conteniendo una cantidad físicamente discreta determinada del inhibidor, que correspondan a una fracción o a un múltiplo de la dosis, que es necesaria para provocar el efecto inhibidor deseado. Las unidades de dosificación pueden contener 1, 2, 3, 4 ó más dosis individuales o 1/2, 1/3 ó 1/4 de una dosis individual. Una dosis individual contiene preferentemente una cantidad suficiente de sustancia activa para lograr en una aplicación según un esquema de dosificación previamente determinado de una o varias unidades de dosificación el efecto inhibidor deseado, administrándose una entera, media o un tercio o un cuarto de la dosis diaria generalmente una, dos, tres ó cuatro veces al día. También se pueden administrar otros agentes terapéuticos. Si bien la dosificación y el esquema de dosificación en todos los casos deberá estar esmeradamente equilibrado, aplicando el juicio profesional, bien basado y teniendo en consideración la edad, la clase y la gravedad de la enfermedad, se encontrará la dosificación generalmente en un margen entre unos 30 hasta 3×10^5 de AIE/kg y entre aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1×10^4 de SIE/kg del peso corporal por día. En algunos casos se logrará así un efecto terapéutico suficiente con una dosis reducida, mientras, en otros casos, será necesaria una dosis mayor.

La aplicación oral se puede realizar empleando unidades de dosificación sólidas y líquidas, tales como, por ejemplo, polvos, tabletas, grageas, cápsulas, granulados, suspensiones, soluciones y similares.

Los polvos se preparan por desmenuzación de la sustancia a un tamaño adecuado y mezcla con un excipiente farmacéutico asimismo desmenuzado. Si bien, generalmente se emplea un carbohidrato comestible, tal como, por ejemplo, fécula, lactosa, 5 sacarosa o glucosa normalmente para esta finalidad y aquí también se pueden emplear, es, sin embargo, deseable utilizar un carbohidrato no metabolizable, tal como, por ejemplo, un derivado de celulosa.

También se pueden emplear simultáneamente edulcorantes, 10 aditivos sazonzantes, agentes de conservación, agentes de dispersión y colorantes.

Las cápsulas se pueden obtener por preparación de la mezcla pulverulenta arriba descrita y llenado en cápsulas de 15 gelatina ya formadas. La mezcla pulverulenta se puede mezclar antes del proceso de llenado con lubricantes, tales como, por ejemplo, gel de sílice, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilenglicol sólido. La mezcla se puede mezclar asimismo con un desintegrador o facilitador de la disolución, tal como, por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio o carbonato 20 de sodio para mejorar en la ingestión de las cápsulas la accesibilidad al inhibidor.

La preparación de las tabletas se efectúa, por ejemplo, mediante la preparación de una mezcla pulverulenta, basta 25 o de gránulo fino, y adición de un lubricante o desintegrador. De esta mezcla se forman las tabletas. Una mezcla pulverulenta se prepara mediante mezcla de la sustancia que se ha desmenuzado en forma adecuada y se agrega un diluyente u otra sustancia excipiente como arriba descrito. En caso dado se agrega un aglutinante: por ejemplo, celulosa carboximetílica, alginatos, 30 gelatina o polivinilpirrolidonas, un retardador de la disolución,

tal como, por ejemplo, parafina, un acelerador de la resorción, por ejemplo, una sal cuaternaria y/o un agente de absorción, tal como, por ejemplo, bentonita, caolina o fosfato dicálcico. La mezcla pulverulenta se puede granular junto con un aglutinante, tal como, por ejemplo, jarabe, pasta de fécula, mucílago de acacia o soluciones de material celulósico o material polimero. Después se pasa el producto a través de un tamiz grande. Como alternativa se puede dejar pasar la mezcla pulverulenta a través de una máquina tabletadora y los trozos irregularmente formados se pueden desmenuzar a tamaño de partícula. Para que los gránulos formados no se queden atascados en las toberas formadoras de tableta se pueden dotar de un lubricante, tal como, por ejemplo, ácido esteárico, sal de estearato, talco o aceite mineral. Esta mezcla así preparada se prensa entonces en forma de tabletas. Las sustancias activas se pueden reunir con excipientes inertes de libre fluidez bajo su presión de las etapas de granulación y desmenuzación. El producto se puede dotar de un revestimiento protector claro u opaco, por ejemplo, de un revestimiento de laca, un revestimiento de azúcar o de sustancias polímeras o un revestimiento pulido de cera. Los colorantes se pueden agregar a estos revestimientos para poder diferenciar entre las distintas unidades de dosificación.

Las formas de preparado a administrar por vía oral, tales como, por ejemplo, soluciones, jarabes y elixires se pueden preparar en unidades de dosificación, de manera que una cantidad de preparado determinada contenga una determinada cantidad de sustancia activa. Del jarabe se puede preparar disolviendo la sustancia activa en una solución acuosa, que tenga sazonantes adecuados; los elixires se obtienen empleando excipientes alcohólicos no tóxicos. Las suspensiones se obtienen por dispersión del compuesto en un excipiente no tóxico. También se

5 pueden agregar facilitadores de la disolución y emulsionantes, tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos y ésteres de sorbita polioxietilénica, agentes de conservación, aditivos mejoradores del sabor, tales como, por ejemplo, aceite de menta o sacarina y similares.

10 Sobre las cápsulas se pueden indicar prescripciones de dosificación. Además, la dosificación se puede asegurar, de manera que la sustancia activa sea cedida en forma retardada, por ejemplo, por retención de la sustancia activa en sustancias polímeras, ceras o similares.

15 La toxicidad de estos compuestos es muy reducida. También sin purificación final, por ejemplo, el producto en bruto del ejemplo 8, que tiene una actividad de 26.000 SIE/g es tolerado, sin que se presenten efectos secundarios al administrar 340.000 SIE/kg al ratón y rata p.os. También en las inyecciones intravenosas toleran los ratones 10.000 SIE/kg sin efectos secundarios.

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener también otros compuestos farmacéuticamente activos, especialmente otros antidiabéticos orales, tales como, por ejemplo, derivados de úrea sulfonílica β -citotrópica y biguanidas reductoras del nivel de azúcar de la sangre.

25 Adicionalmente a las composiciones farmacéuticas arriba mencionadas se pueden preparar también alimentos conteniendo estas sustancias activas; por ejemplo, azúcar, pan, productos de patata, zumos de fruta, cerveza, chocolate y otros artículos de pastelería y consevas, tales como, por ejemplo, mermelada, habiéndose agregado a estos productos una cantidad terapéuticamente activa de como mínimo uno de los inhibidores de la pre-
30 sente invención.

Explicación de algunos reactivos y agentes auxiliares empleados:

5 Como intercambiador de iones se pueden emplear, por ejemplo, los productos que se encuentran en el mercado Amberlite IRA 410 Cl^- (intercambiador de aniones); Amberlite IRC 120 (forma H^+) (intercambiador de cationes fuertemente ácido); Amberlite (forma HCO_3^-) (intercambiador de aniones); Amberlite IRA 410 OH^- (intercambiador de aniones fuertemente básico); Amberlite IRC 50 H^+ (intercambiador de cationes débilmente ácido) [marca de la firma Rohm and Haas Company], así como Döwex 10 50 WX 4 H^+ (intercambiador de cationes fuertemente ácido) [marca de la firma Dow Chemical Co. Midland, Michigan, USA].

Como intercambiador de aniones a base de celulosa se puede emplear, por ejemplo, celulosa DEAE de la firma Schleicher und Schüll.

15 Como gel de poliacrilamida se puede emplear, por ejemplo, bio-gel P-2 [marca de la firma Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA].

Maltzina es un extracto de malta natural de la firma Diamalt AG, München (República Federal Alemana).

20 Lewapoi[®] es una resina de absorción inespecífica de la firma Bayer AG, Leverkusen (República Federal Alemana).

Clarcel es un agente auxiliar de filtración de la firma CECA, Velizy-Villacoublay, Francia.

25 SE 30 es un elastómero de silicona de la firma Hewlett Packard.

Los microorganismos empleados a continuación están depositados en American Type Culture Collection bajo los siguientes números:

Cepa	ATCC-Nº.
SE 50 (CBS 961.70)	310 42
SE 18 (CBS 957.70)	310 41
SE 82 (CBS 615.71)	310 45
5 SE 50/13 (CBS 614.71)	310 43
SE 50/110 (CBS 674.73)	310 44

Ejemplo 1

10 Un fermentador de vidrio conteniendo 8 litros de solución nutriente de la composición 5,0 % de fécula, 1,0 % de extracto de levadura, 0,2 % de K_2HPO_4 se inyecta con un matraz agitador de 3 días de edad de la cepa SE 50/13 (CBS 614.71) y se incuba bajo intensa agitación y ventilación durante 3 días a 28°C y se obtiene un caldo de cultivo con 105.000 AIE/cc.

15 6 litros de este caldo de fermentación se ajustan después de enfriar a 20°C con HNO_3 semiconcentrado a un pH de 2,5, se mezcla con 30 g de carbón activo Carboraffin y se agita durante 10 minutos. A continuación se centrifuga durante 15 minutos a 10.000 rpm y lo sobrenadante claro, amarillo pálido se concentra a 500 cc después de neutralizar con NH_3 . Los 500 cc
20 de concentrado se agitan durante 45 minutos con 200 g de Amberlite IRA 410 Cl^- , se separa por succión y se mezcla con 4/5 Vol. = 400 cc de metanol para precipitar la cantidad principal de los productos de degradación de fécula de alto peso molecular (junto con los restos de carbón activo aún existentes). Se cen-
25 trifuga durante 5 minutos a 5.000 rpm. Los 850 cc de sobrenadante se gotean bajo intensa agitación en 4 litros de alcohol seco. El precipitado coposo blanco se separa por succión, se lava 3 veces con alcohol seco y 2 veces con éter y se seca en vacío a 50°C. Rendimiento: 36 g de un polvo blanco con 10×10^6 AIE/g.

En alguno de los ejemplos a continuación se emplea este preparado.

Inhibición de enzimas en placas de capa delgada

5 Para enjuiciar el producto final de las fermentaciones y de la composición de los preparados mediante cromatografía de capa delgada se aplica 1 μ l de los caldos de fermentación ó un 1 μ g de los preparados sobre láminas terminadas de gel de sílice (firma Schleicher y Schüll, Dassel, Tipo F 1500) y se revela 2 veces en n-butanol/etanol/agua = 50/30/20.

10 Para el teñido de inhibición de sacarasa se pulveriza la placa revelada y bien secada con gel de enzima (20 cc/placa de 20 x 20 cm) y se deja solidificar el gel. Después se incuba previamente durante 5' en una cámara húmeda a temperatura ambiente y a continuación se pulveriza plenamente con gel de sustrato.
15 Después de solidificar esta segunda capa de gel se introduce la placa en una cámara húmeda y se incuba a 40°C. El teñido de inhibición (manchas claras, fondo marrón rojizo) se revela en 60 - 90'. En el momento del desarrollo de color óptimo se interrumpe y la placa con las capas de agar, que se encuentran sobre
20 ella, se secan con aire caliente empleando un ventilador.

Preparación de los geles:

25 Gel de enzima: 1,5 g de agarosa (L'Industrie Biologique Francais) se suspenden en 100 cc de tampón de Na-maleinato 0,2 M pH 6,0 y a continuación se disuelve por hervor. La solución de agarosa clara se enfría a 50°C y se mezcla con 250 μ l de solución de Triton X - 100 (2 g de Triton X-100 + 8 g de etanol p.a.) y 0,5 cc de solución de dianisidina (20 mg de dianisidina/1 cc de acetona) bajo agitación. Directamente antes del uso del gel se agrega 1 cc de reactivo GOD/POD (12,5 mg de glucoseoxida-

sa, grado de pureza I, firma Boehringer, y 2,5 mg de peroxidasa, grado de pureza II, liofilizado, firma Boehringer, disuelto en 5 cc de tampón de maleinato) y 4 a 5 unidades de sacarasa del intestino delgado porcino. El gel se ha de mantener a 50°C hasta su pulverización, ya que, en caso contrario, solidifica en las toberas durante el proceso de pulverización.

Gel de sustrato: 0,5 g de agarosa se suspenden en 100 cc de tampón de Na-maleinato, pH 6,0, y se disuelve bajo hervor. Se enfría a continuación a 50°C, se mezcla con 100 µl de Triton (2 g de Triton X-100 + 8 g de etanol p.a.) y se agrega 1 g de sacarosa (Serve N° 35579). Después de disolverse la sacarosa el gel está listo para su uso.

Para el teñido de la inhibición de amilasa se pulveriza la placa DC revelada y secada con un gel de amilasa (20 cc/ placa de 20 x 20 cm) y se deja solidificar. Después de una incubación previa durante 5' a temperatura ambiente se introduce la placa con la capa de gel en una solución de fécula al 0,5 % (1 g de fécula, Merck n° 1252, se disuelve en 200 cc de tampón de glicerofosfato 0,2 m, CaCl₂ 0,01, pH 6,9, bajo hervor) y se deja durante 2' a 40°C bajo agitación de la solución. Después se enjuaga la placa bien con agua destilada y para el teñido de la fécula no disociada se introduce en una solución de I₂ diluída (4 cc de solución básica de I₂ por 500 cc de H₂O; solución base I₂: 2,2 g de I₂ + 4,4 g de KI disueltos en 100 cc de H₂O). Después de 1 minuto el teñido es óptimo. Se fotografía inmediatamente, ya que las manchas azules palidecen rápidamente.

Preparación del gel de amilasa:

1 g de agarosa se disuelve en 100 cc de tampón de glicerofosfato sódico 0,2 m/CaCl₂ 0,01 m, pH 6,9 a 100°C, después de enfriar a 50°C se agregan 100 µl de Triton X-100 (2 g de Tri-

ton X-100 + 8 g de etanol p.a.). Directamente antes de la pulverización se agregan 100 µl de una suspensión cristalina de amilasa (10 mg de amilasa de páncrea porcina/cc de solución de NH₄-sulfato saturada, firma Boehringer.

5 Ejemplo 2

Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad con 120 cc de una solución nutriente compuesta de un 4 % de fécula, 2,4 % de glucosa, 0,9 % de hidrolizado de caseína y 0,9 % de extracto de levadura, pH ajustado con NaOH a 7,6, mezclado con 10 0,4 % de CaCO₃ y esterilizado durante 30 minutos a 121°C se inyecta con 3 cc de un cultivo previo de la cepa SE 82 (CBS 615.71), cultivado en un caldo nutriente compuesto de un 2 % de fécula, 1 % de glucosa, 0,5 % de hidrolizado de caseína y un 15 1 % de extracto de levadura, pH ajustado a 7,2 con NaOH, mezclado con un 0,4 % de CaCO₃ y esterilizado durante 30 minutos a 121°C, y cultivando durante 5 días a 28°C en una máquina agitadora circular, se obtiene una solución de cultivo con 122.000 AIE/cc. Para la elaboración se separa el micelo de la soluciones de cultivo reunidas por centrifugación a 12.000 rpm, 300 cc 20 del filtrado de cultivo se ajustan con HNO₃ semiconcentrado a un pH de 2,5 y se agita durante 10 minutos con 2,5 g de carbón activo p.A. Después de separar el carbón a 12.000 rpm se mezcla la solución neutralizada a un pH de 6 con KOH 10-n con 300 cc del precipitado. Si lo sobrenadante se gotea en 3 litros de 25 etanol, el precipitado se aísla después de reposar brevemente por centrifugación a 12.000 rpm, el precipitado se lava dos veces con etanol absoluto y una vez con éter y se seca en vacío, se obtienen 2,23 g de un producto con $7,45 \times 10^6$ AIE/g, que en 30 más de un 95 % contiene compuesto con $n_1 \div n_2 = 4$ y más unidades

de glucosa.

Ejemplo 3

Inyectando un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad con 120 cc de una solución nutriente de la composición
5 3,5 % de glucosa, 2 % de fécula, 0,5 % de hidrolizado de caseína, 1,3 % de extracto de levadura, 0,3 % de CaCO_3 y 0,3 % de K_2HPO_4 , ajustado a 7,8 antes de la esterilización 30'/121°C, se inyecta con 6 cc de un cultivo previo de la cepa SE 50/110 en una solución nutriente compuesta de 3 % de harina de soja,
10 3 % de glicerina y 0,2 % de CaCO_3 y se cultiva durante 3 - 4 días en una máquina agitadora circular a 24°C, se obtiene un caldo de cultivo, que contiene 153.000 AIE/cc y 12.200 SIE/litro.

1 litro de solución de cultivo se ajusta con HNO_3 a
15 un pH de 2,5, se agita con 5 g de carbón activo durante 10' y a continuación se centrifuga durante 30' a 5000 rpm. A continuación se neutraliza mediante adición de 25 g de Amberlite IRA 410 (forma OH^-). Lo sobrenadante neutro se rota a 100 cc, se mezcla con 100 cc de metanol y se filtra. El filtrado se introduce y agita en 2 litros de alcohol seco, el precipitado obtenido se separa por succión y después de lavar 3 veces con acetona y éter se seca en vacío.
20

Rendimiento 14 g de un polvo blanco con 5×10^6 AIE/g, que contiene principalmente compuestos con como mínimo $n_1 + n_2 =$
25 4 unidades de glucosa.

Ejemplo 4

Trabajando según el ejemplo 3, pero, sin embargo, con 0,5 % de fécula se obtiene después de una fermentación de 4 días un caldo de cultivo con 40.000 AIE y 184 SIE/cc. El caldo de cultivo contiene una mezcla de los compuestos de la presente invención, que tienen como mínimo una unidad de glucosa.

Ejemplo 5

Injectando un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contiene 120 cc de solución nutriente de la composición 3 % de glucosa, 0,6 % de hidrolizado de caseína, 1,6 % de extracto de levadura, 0,3 % de CaCO_3 , 0,3 % de K_2HPO_4 , pH ajustado a 7,8 con KOH antes de la esterilización, con un cultivo previo de la cepa SE 50/110 (CBS 674.73) según el ejemplo 3 y cultivando durante 4 días a 24°C en una máquina de agitación circular, se obtiene un caldo de cultivo con 10.800 SIE/litro, que contiene principalmente el compuesto de la presente invención con una unidad de glucosa.

5 litros de filtrado de cultivo, separado del micelo a 13.000 rpm, se ajusta con HNO_3 semiconcentrado a un pH de 2,5 y se agita durante 15 minutos con 55 g de carbón activo ("Merck") y 200 g de Clarcel. Después de separar los sólidos por succión se neutraliza con amoníaco concentrado a un pH de 7, la solución se concentra a 1,5 litros y se precipita con 5 veces su cantidad de etanol. El precipitado coposo resultante se separa mediante un rotor de paso a 12.000 rpm y lo sobrenadante amarillento se concentra a 150 cc y para la separación de las reducidas partes de material sin disolver se centrifuga con reducido número de revoluciones. 50 cc de esta solución se introducen en una columna llena con Amberlite IR 120 (forma

H⁺) (30 x 300 nm; 30 cc de H₂O por hora). Después de haber reco-
gido, en total, 300 cc de eluado, que contiene sacáridos inertes,
así como una parte de componentes activadores de la inhibición
no absorbidos, se traslada el intercambiador con unos 400 cc
5 de H₂O a una copa de vidrio y bajo agitación se agrega amoniaco
concentrado hasta alcanzar un pH de 11,5. Después de agitar
durante otros 30 minutos se separa del intercambiador, se con-
centra a 1/20 del volúmen, se filtra a través de una columna
(20 x 150 nm) con Amberlite IRA 410 (forma HCO₃[']) y a una velo-
10 cidad de flujo de 30 cc/hora se recogen unos 500 cc de eluado,
que se concentran y que después de liofilizar dan 1,3 g de produc-
to en bruto.

Para la ulterior purificación se fracciona el prepa-
rado en bruto en bio-gel P-2, 100 - 200 mallas (firma Bio-Rad,
15 München). Para ello sirve una columna de 50 mm diámetro y
450 mm de longitud, que se accionó con H₂O a una velocidad de
flujo de 40 cc/hora, recogiéndose las fracciones de cada 10 cc.
Todas las fracciones se comprobaron mediante el ensayo antróni-
co respecto a los carbohidratos, así como mediante el ensayo de
20 inhibición de sacarasa con respecto a los componentes activos
en sentido inhibidor. Las fracciones que contienen inhibidor
de sacarasa se comprobaron, además, por cromatografía de capa
delgada según el ejemplo 1 con respecto a su contenido en com-
ponentes individuales. Aquellas fracciones, que contienen el
25 compuesto con una unidad de glucosa, se reunieron, concentraron
y liofilizaron. Se obtienen 35 mg de la sustancia con 0,3 x 10⁶
AIE/g y 30.000 SIE/g.

Ejemplo 6

30 Inyectando matraces de Erlenmeyer de 1 litro de capa-
cidad, en cada caso con 120 cc de una solución nutriente de la

composición 5 % de fécula, 1 % de extracto de levadura, 0,2 % de K_2HPO_4 , en cada caso con 2 cc de un cultivo previo según el ejemplo 3, se obtienen después de una incubación durante 3 días a 28°C soluciones de cultivo con el siguiente rendimiento en
5 inhibidor de amilasa:

Cepa	AIE/cc
SE 50 (CBS 861.70)	37.000
SE 50/13 (CBS 614.71)	109.000
SE 50/110 (CBS 674.73)	53.500

10 que principalmente se compone de una mezcla de compuestos con 4 o más unidades de glucosa.

Ejemplo 7

Inyectando matraces de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, en cada caso con 120 cc de solución nutriente de la composición 1,3 % de maltosa, 3,5 % de glucosa, 0,5 % de hidrolizado de caseína, 1,3 % de extracto de levadura, 0,3 % de $CaCO_3$, 0,3 % de K_2HPO_4 , en cada caso con 2 cc de un cultivo previo según el ejemplo 3, se obtiene, después de una incubación durante 4 días en máquinas de agitación circulares a 24°C, con distintas
20 cepas los siguientes rendimientos:

Cepa	SIE/cc	AIE/cc
SE 50 (CBS 961.70)	25	580
SE 50/13 (CBS 614.71)	14,8	1460
SE 50/110 (CBS 674.73)	57,9	755

25 que principalmente se componen de una mezcla de los compuestos con 4 o menos unidades de glucosa.

Ejemplo 8

Injectando un fermentador con 100 litros de solución nutriente de la composición 3,5 % de glucosa, 2,5 % de maltzina, 0,5 % de hidrolizado de caseína, 1,3 % de extracto de levadura, 5 0,3 % de CaCO_3 , 0,3 % de K_2HPO_4 y 0,1 % de agente antiespumante con 5 litros de un cultivo previo según el ejemplo 3 y se incuba bajo agitación y ventilación durante 5 días a 24°C , se obtiene una solución de cultivo con 73.000 SIE/litro, que contiene principalmente el compuesto de la presente invención con $n_1 + n_2 =$ 10 2.

90 litros de preparado de fermentación se ajustaron con micelo en el medidor de pH con HNO_3 concentrado a un pH de 2,5 y bajo agitación se mezcló con 900 g (= 1 %) de carbón activo (Merck) para la absorción de la cantidad principal de los colorantes formados. Se agita durante 15 minutos, se separa a través de una centrífuga a 3.000 rpm del micelo y la cantidad principal del carbón y lo sobrenadante se filtra, finalmente, bajo 15 adición de 3 kg de Clarcel a través de un filtro de presión. Se obtienen 61 litros de filtrado claro, marrón amarilento, con 20 un contenido en SIE de 60.000 SIE/litro.

El filtrado se ajusta con NH_3 concentrado a un pH de 7 y para la absorción de la sustancia activa se agita durante 30' con 1.300 g (2 %) de carbón activo (Merck). Se filtra a través de un filtro de presión y el sedimento de carbón activo 25 se lava 3 veces con 10 litros de agua destilada. A continuación se introduce el carbón bien seco y se agita en 3 veces 4 litros de acetona al 50 % a un pH de 2,5 en cada caso durante 15' para desorber la sustancia activa del carbón. Los desorbatos acéticos se reúnen después de separar el carbón por filtración. 30 El desorbato reunido se concentra en el evaporador rotativo a

250 cc y se mezcla con el mismo volúmen (250 cc) de metanol y se filtra a través de un filtro de pliegues. El filtrado (480 cc) se gotea bajo fuerte agitación en 5 litros de acetona. El precipitado obtenido se separa por succión y se lava 3 veces con acetona y éter. A continuación se seca en vacío a 35°C. Rendimiento 230 g con 8500 SIE/g.

25 g del producto en bruto de arriba se disuelven en 1 litro de H₂O y se agita con 300 g de Dowex^R 50 WX 4 H⁺ (200 - 400 mallas) durante 30'. La resina se separa por filtración y se lava 3 veces con 2 litros de HCl 0,001-n. El Dowex lavado se suspende a continuación en 500 cc de H₂O y la suspensión se ajusta en el medidor de pH mediante adición de NH₃ al 25 % a un pH de 9,0. A continuación se desorbe aún 2 veces, cada una con 500 cc de NH₃ al 0,6 %, los desorbatos se reúnen y en el evaporador rotativo se concentra a 100 cc. Para descolorear este concentrado se agita con 2 g de celulosa DEAE (firma Schleicher und Schüll N° 02035, 0,6 mVal/g) durante 5 minutos, después se centrifuga. Lo sobrenadante amarillo pálido se mezcla con el mismo volúmen (100 cc) de metanol y se después se gotea bajo intensa agitación en 2 litros de acetona. El precipitado se separa por succión, se lava con acetona y éter y se seca en vacío a 35°C. Rendimiento 4,2 g con 26.000 SIE/g.

Para la ulterior purificación fina se filtran los 4,0 g de inhibidor en porciones de 0,5 g a través de bio-gel P-2. Para ello se aplicaron, en cada caso, 0,5 g del preparado, disueltos en 10 cc de H₂O, sobre una columna de bio-gel P-2 (200 - 400 mallas, firma Bio-Rad) del diámetro 5 cm y de la longitud 95 cm. Se reveló en agua con una proporción de flujo de 80 cc/h. Se recogieron 12 cc de fracciones. De todas las fracciones se determinó el contenido total en carbohidrato (en forma

de ensayo antranónico como extinción en E_{620}), así como el contenido en inhibidor de sacarasa e inhibidor de amilasa. Además se comprobaron las fracciones por cromatografía de capa delgada (teñido de inhibición de enzima según el ejemplo 1).

5 Las fracciones, que contienen los compuestos con 4 - 6 unidades de glucosa se reúnen, se concentran en vacío a 10 cc y se precipita mediante goteado en 200 cc de alcohol seco. El precipitado se separa por centrifugación, se lava con acetona y éter y se seca en vacío; rendimiento de 4,0 g de inhibidor en bruto: 0,2 g de los compuestos con 4 - 6 unidades de glucosa con $17,5 \times 10^6$ AIE/g y 8.500 SIE/g. Las fracciones conteniendo el compuesto con 3 unidades se elaboraron en igual forma efectuándose la precipitación con 200 cc de acetona; rendimiento de 4,0 g de inhibidor en bruto: 0,1 g del compuesto con $n_1 + n_2 = 3$, con $1,4 \times 10^6$ AIE/g y 21.000 SIE/g. De las fracciones conteniendo el compuesto con $n_1 + n_2 = 2$ (precipitado con acetona) se aislaron 0,9 g del compuesto con $n_1 + n_2 = 2$ unidades con $0,3 \times 10^6$ AIE/g y 68.000 SIE/g.

Ejemplo 9

20 Si 3 fermentadores pequeños, cada uno con 8 litros de capacidad, con la solución nutriente de 7,5 % de maltzina, 0,3 % de hidrolizado de caseína, 0,7 % de extracto de levadura, 0,3 % de CaCO_3 , 0,3 % de K_2HPO_4 se inyecta con un 5 % de un cultivo previo de la cepa SE 50/110 (CBS 674.73) (obtenida según el ejemplo 3), se obtiene después de un incubación durante 5 días a 25 24°C un caldo de cultivo con 73 SIE/cc, que contienen principalmente el compuesto con $n_1 + n_2 = 2$. Después de centrifugar (30', 3000 rpm) para la separación del micelo se obtienen 20,5 litros de una solución de cultivo marrón oscura con 67.000 SIE/l. Se ajusta con HNO_3 a un pH de 3,5 y para eliminar el co-

30

lor se agregan 60 g de Lewapol (Ca 9221, granulometría 0,35 mm, firma Bayer)/l = 1,23 kg de Lewapol. Después de agitar durante 20' se separa por succión a través de un filtro Seitz K 3.

La solución de cultivo descoloreada se neutraliza con NH_3 (18,5
5 litros, 67.000 SIE/l). Se agita a continuación para la absorción de la sustancia activa con 20 g de carbón activo/l = 370 g y se sigue agitando durante 30'. A continuación se separa por filtración a través de un filtro Seitz K3, que está alimentado con una capa del agente auxiliar de filtración Clarcel. El fil-
10 trado (17,5 litros, 3600 SIE/l) se desecha. El residuo de carbono se lava 3 veces con 2 litros de agua destilada. Para la desorción de la sustancia activa del carbón se agita éste 3 veces consecutivas, en cada caso con 1 litro de acetona al 80 % durante 15', ajustándose el pH con HCl concentrado a 2,5. Los
15 desorbatos se reúnen (2,4 litros, 371.000 SIE/l). En este desorbato se introducen 20 g de Dowex H^+ /l (Dowex 50 W X 4, H^+ , firma Serva Heidelberg) = 46 g de Dowex y se agita durante 20'. A continuación se separa la resina por filtración (fracción Dowex I) y se lava ulteriormente con algo de acetona al 75 %. El fil-
20 trado y el líquido de lavado (3 litros = 215.000 SIE/l) se agitan con 60 g de Amberlite IRA 410 (forma OH^-) (firma Serva Heidelberg)/l hasta alcanzar el pH de 7. A continuación se separa por filtración y el filtrado (2,8 l, 219.000 SIE/l) se mezcla con 72 g de Dowex H^+ y se agita durante 20 minutos. El pH se
25 mantiene en 3,0 dejando colgada una bolsa de nylon porosa llena- da con Amberlite IRA 410 OH^- . A continuación se separa por fil- tración del Dowex (fracción Dowex II), el filtrado (2,6 l, 27.000 SIE/l) se desecha.

Las fracciones de Dowex I y II se lavan cada una en
30 forma independiente tres veces con acetona al 75 % a un pH de 3,5 y a continuación se desorbe cada vez 3 veces, en cada caso

con 100 cc (fracción Dowex I) ó bien 150 cc (fracción Dowex II) con NH_3 al 0,6 %. En la primera desorción, en la que la cantidad de amoníaco no fué suficiente para la neutralización de la resina Dowex, se ajustó mediante adición de NH_3 concentrada en el medidor de pH un pH de 9. Los tres desorbatos de la fracción Dowex I y II se reunieron, se concentraron en el evaporador rotativo casi hasta sequedad, se recogieron en 50 cc de H_2O , se ajustó en el medidor de pH con HCl a un pH de 3 - 4 y se mezcló con 50 cc de metanol. Las soluciones se gotean en 1,5 litros de acetona absoluta bajo agitación, el precipitado obtenido se separa por succión y se lava 3 veces con acetona, así como una vez con éter. Se seca en vacío.

Rendimiento: Fracción I 6,5 g 25.000 SIE/g
Fracción II 12,3 g 36.000 SIE/g.

La fracción I y II contienen como componentes activos inhibidores principalmente el compuesto de la presente invención con $n_1 + n_2 = 2$ además de reducidas partes del compuesto con $n_1 + n_2 = 3$.

La tabla a continuación señala las actividades inhibitoras de sacarasa del preparado en escalas consecutivas:

<u>Rendimiento</u>		Volúmen (1)	SIE/1	SIE total	Rendi- miento en SIE %
5	1) solución de cul- tivo	20,5	67000	1 373 500	100
10	2) después del des- coloreamiento de Lewapol	19,5	67000	1 306 500	95
	3) después de ad- sorcpción de carbón activo	18,5	3600	66 600	(4,8 desecha- do)
	4) 1 ^{er} desorbato	0,7	74200	519 400)	37,8)
15	5) 2 ^o "	0,9	329000	296 100)883500	21,6)64,4
	6) 3 ^{er} "	0,8	85000	68 000)	5,0)
	7) desorbato mixto (4-6)	2,4	371000	890 400	64,8
20	8) después de la 1 ^a adsorcpción de Dowex	3,0	215000	645 000	
	9) después de neutrali- zación con IRA OH ⁻	2,8	219000	613 200	
25	10) después de 2 ^o ad- sorcpción de Dowex	2,5	27000	67 500	(4,9 desecha- do)
	11) desorbatos NH ₃ reu- nidos de la fracción Dowex I	0,29	682000	197 780	14,4)
30	12) " de la fracción Dowex II	0,45	1 419000	638 550	46,5)
	13) Precipitación Fracción I	6,5 g	25000/g	162 500	11,8)
	Precipitación Fracción II	12,3 g	36000/g	442 800	44,0)

Ejemplo 10

200 g de un preparado como se ha descrito en el ejemplo 1 se disuelve en 940 cc de agua destilada y 60 cc de H_2SO_4 concentrado y se calienta durante 4 horas bajo reflujo (temperatura interior: 98 - 100°C; temperatura del baño de aceite: 140°C).
5 La solución marrón negruzca enfriada se mezcla con 10 g de carbón activo (Merck Art. 2186) y se agita durante una hora. Después se separa el carbón activo por succión, se lava con agua y el filtrado se ajusta con aproximadamente 250 cc de KOH 10-n a un pH de 7 a 8. La solución se agita durante una hora con 50 g
10 de carbón activo. El carbón se separa por succión, se lava con 2 litros de agua y el filtrado se desecha. Para la desorcpción se dirigiere el carbón durante la noche con 2 litros de alcohol al 30 %. Finalmente se separa el carbón por succión y la solución
15 alcohólica se concentra en el evaporador rotativo. Residuo: 6,2 g. Este producto en bruto (6,2 g) se disuelve en 500 cc de agua y se agita cuidadosamente durante una hora con 30 g de Amberlite IR 120 (forma H^+). El intercambiador se separa por succión y se lava con agua destilada hasta que el filtrado esté
20 neutro y libre de glucosa. El intercambiador se agitó entonces con 25 cc de NH_3 al 25 % en 1000 cc de H_2O durante la noche, se separó y desechó. El filtrado se concentró en el evaporador rotativo. Residuo: 3,7 g.

Para la ulterior purificación se efectuó una cromatografía en celulosa. 4,5 g del material desorbido del intercambiador se aplican sobre una columna de 1 m de longitud y 3,5 cm de
25 ancho llenada con celulosa. Como eluyente se emplean primeramente etanol/ H_2O 5:1, para eluir el compuesto de la presente invención con $n_1 = 1$ se empleó primeramente etanol/ H_2O 3:1. Con una
30 velocidad de goteado de 20 gotas por minuto se recogieron frac-

5 ciones de 14 cc cada una. Las distintas fracciones se comprobaron por cromatografía de capa delgada. Las fracciones 47 - 85 suministran después de la concentración 1,6 g de un compuesto según la presente invención con una unidad de glucosa, ligeramente teñido marrón. Las impurezas colorantes no tienen cuantitativamente importancia alguna. Como resina incolora se obtiene el compuesto con $n_1 + n_2 = 1$ cuando la etapa de purificación se efectúa con intercambiador de iones fuertemente ácido y no por el procedimiento de tandas, sino en una columna.

10 Ejemplo 11

200 g de un preparado como en el ejemplo 1 se disuelve en 940 cc de agua destilada y 60 cc de H_2SO_4 concentrado y se calienta durante 1/4 horas bajo reflujo (temperatura interior: 98 - 100°C; temperatura del baño de aceite: 140°C). La solución marrón negruzca enfriada se mezcla con 10 g de carbón activo (Merck, Art. 2186) y se agita durante una hora. Después se separa el carbón activo por succión, se lava con agua y el filtrado se ajusta con unos 250 cc de KOH 10-n a un pH de 7 a 8. La solución se agita durante una hora con 50 g de carbón activo. El carbón se separa por succión, se lava con 2 litros de agua y el filtrado se desecha. Para la desorción se digiere el carbón durante la noche con 2 litros de alcohol al 30 %. Finalmente se separa el carbón por succión y la solución alcohólica se concentra en el evaporador rotativo. Residuo: 8,0 g.

25 El residuo se recoge en 15 cc de H_2O y se aplica a una columna llenada con 50 g de Amberlite IR 120 (forma H^+) (altura: 20 cm, diámetro 2,4 cm). Se deja trabajar con 3 gotas/minuto y se lava ulteriormente con agua (12 gotas/minuto), hasta que estén retirados todos los componentes no básicos.

30 Después se eluyen los productos básicos de la columna con NH_3

al 0,5 % (12 gotas/minuto) y la solución acuosa se seca en el evaporador rotativo. Residuo: 4,1 g.

2 g de este residuo se disuelven en poca agua y se aplican en una columna llenada con Sephadex G-15 (altura: 200
5 cm; diámetro: 3,0 cm). Se eluye con agua. Con una velocidad de flujo de 8 cc/hora se recogen fracciones de cada vez 2 cc. Las distintas fracciones se comprueban por cromatografía de capa delgada. Las fracciones 85 - 94 suministran 280 mg del compuesto con $n_1 + n_2 = 2$ con una actividad específica de 50.000
10 SIE/g.

Ejemplo 12

Si se incuban 2 g de un preparado como descrito en el ejemplo 1 en 60 cc de tampón de glicerofosfato sódico 20 mM, pH 6,9 y 1 mM en CaCl_2 con 1 g de α -amilasa de *Aspergillus spec.* (SERVA nº 13418) bajo agitación constante durante 120 ho-
15 ras a 37°C, a continuación se calienta durante 5 minutos a 100°C y se centrifuga a 4000 rpm de lo insoluble, se obtiene después de la liofilización de la solución 1,9 g de un producto con 3500 SIE/g y 2×10^6 AIE/g. Comprobando este producto mediante
20 cromatografía de capa delgada y coloreamiento de inhibición de sacarasa como descrito en el ejemplo 1, se aprecia que como compuestos activos inhibidores esencialmente se encuentran los compuestos con $n_1 + n_2 = 1, 2$ y 3 según la presente invención.

Ejemplo 13

25 Si se incuban 2 g de un preparado como en el ejemplo 1 en 30 cc de tampón de acetato 20 mM del pH 4,8 con 1,25 mg de β -amilasa de batata (BOEHRINGER) bajo agitación constante durante 120 horas a 37°C, a continuación se calienta durante 5 minutos a 100°C y se centrifuga a 4000 rpm de lo insoluble, se

obtiene, después de la liofilización de la solución, 1,5 g de un producto con 1800 SIE/g y $3,8 \times 10^6$ AIE/g. Comprobando este producto mediante cromatografía de capa delgada y coloreamiento de inhibición de sacarasa como descrito en el ejemplo 1, se aprecia que como compuestos activos inhibidores se presentan esencialmente los compuestos de la presente invención con $n_1 + n_2 = 2$ y 3.

Ejemplo 14

10 Inyectando en un matraz de Erlenmeyer de 200 cc de capacidad llenado con 25 cc de una solución nutriente de la composición 0,1 % de K_2HPO_4 , 0,2 % de $(NH_4)_2SO_4$, 0,05 % de $MgSO_4$, 0,05 % de KCl, 0,01 % de $FeSO_4$, 2 % de un preparado como descrito en el ejemplo 1, con una suspensión de esporas de la cepa Asp.niger ATCC 11394 y se incubaba a $28^\circ C$ en una máquina agitadora circular baja después de 6 días el título AIE de 210.000 AIE/cc a 53.000 AIE/cc y después de 10 días a 21.300 AIE/cc. Simultáneamente aumenta el contenido en SIE/cc de 7,0 a 72 SIE/cc.

20 20 cc de una solución incubada durante 10 días con la suspensión de esporas se centrifugó para la separación del micelio durante 30 minutos a 3.000 rpm. Los 15 cc de sobrenadante (72.000 SIE/l) se desalaron agitando durante 30 minutos con 2 g de Amberlite IRC 50 H^+ y 1 g de Amberlite IRA 410 OH^- (conductibilidad inferior a 2 m S cm^{-1}). Se separa por filtración y el filtrado se deja pasar con 5 cc/h a través de una columna equilibrada con Dowex H^+ en HCl 0,001-n, (diámetro 1 cm x 10 cm). A continuación se lava ulteriormente con 200 cc de HCl 0,001-n. Para la desorción se bombea solución de NH_3 0,6 % a través de la columna (10 cc/h) y se recogen fracciones de 5 cc. Las fracciones, que contienen actividad inhibidora de la

25

30

sacarasa se reúnen, se rotan en el evaporador rotativo a 2 cc y se mezcla con 2 cc de metanol. Esta solución se ajusta a un pH de 3 - 4 y se hace precipitar mediante goteado en 100 cc de acetona. El precipitado se separa por succión, se lava con acetona y éter y se seca en vacío. Rendimiento: 26 mg con 5 28.000 SIE/g, compuesto de compuestos con $n_1 + n_2 = 2$ y 3. La obtención del compuesto puro con $n_1 + n_2 = 2$ de este producto se efectúa como indicado en el ejemplo 8 por filtración de gel a través de una columna con bio-gel P-2. Se obtienen 7 mg del 10 compuesto con $n_1 + n_2 = 2$ de 60.000 SIE/g.

Ejemplo 15

2 litros de filtrado de cultivo, que se obtiene de un preparado de fermentación como descrito en el ejemplo 5 por centrifugación del micelo a 13.000 rpm y que tiene una actividad de 13.000 SIE/g, se agita para reducir el contenido de sal (conductibilidad del filtrado de cultivo: aprox. 10 mS.cm^{-1}) con 15 500 g de una mezcla de 2,5 partes de Amberlite IRC 50 (forma H^+) y 1 parte de Amberlite IRA 410 (forma OH') durante una hora. El intercambiador se separa, la solución se concentra a algo 20 menos de 100 cc y para retirar los componentes insolubles se centrifuga a 20.000 rpm durante 15 minutos. Lo sobrenadante se completa a 100 cc; éste presenta ahora una conductibilidad de $3,5 \text{ mS.cm}^{-1}$ y para su ulterior limpieza se aplicó a una columna (55 x 400 mm) con P-celulosa (SERVA N° 45130; preparada según 25 métodos conocidos y en tampón de fosfato amónico 5 mM; pH 5,5; equilibrado). Como eluyente sirvió el mencionado tampón de fosfato; la velocidad del flujo ascendió a 90 cc/hora, y se recogieron fracciones de 18 cc de volúmen.

Después de haber comprobado las fracciones del eluado 30 en su contenido en carbohidratos (mediante ensayo antrónico)

y componentes inhibidores de la sacarasa (mediante ensayo de inhibición de sacarasa), se reunieron aquellas fracciones, que en el ensayo antrónico demostraron estar casi libres de carbohidratos y en el ensayo inhibidor de sacarasa demostraron ser especialmente eficaces (fracciones 60 - 170), se concentra a 150 cc y se filtra a través de una columna (50 x 300 mm) con Amberlite IRA 410 (forma HCO_3^-). Para mejor control de la desionización se recogió el eluado en fracciones (10 cc por fracción en 20 minutos) y se comprobó en fosfato (mediante reactivo de molibdato de ácido ascórbico: en su mayoría negativo) e inhibición de sacarasa (ensayo de inhibición de enzima). Las fracciones activas de la inhibición (3-30) se reunieron, se concentraron y liofilizaron, se volvieron a disolver de nuevo y se liofilizaron para obtener 280 mg de inhibidor en bruto.

Para la ulterior purificación se fracciona el inhibidor en bruto en bio-gel P-2 como descrito en el ejemplo 6. De las fracciones, que contenían el compuesto puro con $n_1 + n_2 = 1$ se aislan después de la liofilización 30 mg de un producto con $0,3 \times 10^6$ AIE/g y 35.000 SIE/g.

20 Ejemplo 16

Para la obtención de derivados de aminoazúcar con 5 - 7 unidades de glucosa se parte, por ejemplo, de un preparado, tal y como se ha descrito en el ejemplo 1.

Para ello se disolvieron 30 g del preparado según el ejemplo 1 en 250 cc de H_2O . La conductibilidad de esta solución asciende a 10 mS.cm^{-1} , el pH a 5,5. Para su desalado se mezcló la solución con 60 g de Amberlite IRC 50 H^+ (intercambiador de cationes débilmente ácido, que liga los derivados de aminoazúcar en solución acuosa sólo en huellas) y 20 g de Amberlite IRA 410 OH^- y se agita durante 20 minutos. El filtrado (conductibilidad

0,5 mS.cm⁻¹, pH 3,5) se ajusta con HCl 1-n a un pH de 3,0 (conductibilidad 0,6 mS.cm⁻¹). Esta solución se bombea con 42 cc/h a través de una columna (diámetro 2,5 cm, altura 40 cm, equilibrada en HCl 0,001-n llena con Dowex 50 W (H⁺), y a
5 continuación se lava ulteriormente con 2 litros de HCl 0,001-n. Después de lavar la columna se eluye con 1,2 % de amoníaco acuoso y se recogen fracciones de 10 cc. Las fracciones inhibitori- camente activas se reúnen, el amoníaco se extrae en vacío y la solución se concentra a continuación en vacío a 30 cc. Median-
10 te goteado en 600 cc de alcohol seco se precipita, el precipita- do se separa por succión y se seca en vacío después de lavar con alcohol y éter. Rendimiento 4,4 g con 26,5 x 10⁶ AIE/g.

Cada vez 0,5 g se aplicaron para la purificación fina sobre una columna preparativa de bio-gel P-2 como descrito en
15 el ejemplo 8 y se reveló. Se reunieron las fracciones, que con- tienen después de DC (teñido de inhibición de amilasa) compues- tos con $n_1 + n_2 = 5 - 7$, se concentran en vacío y se precipitan como arriba descrito con alcohol seco. Rendimiento de 0,5 g de producto en seco: 0,2 g de derivados de aminoazúcar con $n_1 +$
20 $n_2 = 5 - 7$ con 30 x 10⁶ AIE/g y 2.500 SIE/g.

Ejemplo 17

Este ejemplo muestra cómo los compuestos de la pre- sente invención se pueden eluir de los intercambiadores de catio- nes bajo condiciones ácidas.

25 Se llena una columna del diámetro 1,5 cm con 30 g (peso en húmedo) de Dowex^R 50 W x 4, (H⁺) 200 - 400 mallas en HCl 0,001-n. A continuación se bombean 500 cc de desorbato mix- to (400.000 SIE/l, pH 2,5, 60 % de acetona), obtenida según el ejemplo 9 (tabla número 7) en aproximadamente 1 hora a través
30 de la columna y a continuación se lava con 500 cc de HCl

0,001-n. Bajo estas condiciones se eluyen sólo actividad en huellas. A continuación de esto se desorbió con HCl 0,0125-n, registrándose la conductibilidad o el índice de refracción del eluado de la columna. Además se comprobó el contenido en SIE
5 del eluado. Las fracciones activas 74 - 100 se reunieron y se neutralizaron mediante adición de Amberlite IRA 410 OH⁻, después se concentró a 5 cc, se reaccionó con 5 cc de metanol y se precipitó mediante goteo en 200 cc de acetona. Después de lavar con acetona y éter se secó en vacío.

10 Rendimiento 1 g del compuesto con $n_1 + n_2 = 2$ con 65.000 SIE/g.

De las fracciones previas activas se pueden obtener los compuestos con $n_1 + n_2 = 3$ y 4 unidades de glucosa.

Este procedimiento de la desorción ácida permite, por lo tanto, contrario a la desorción alcalina, un fraccionamiento de los distintos derivados de aminoazúcar de esta serie.
15

Si la sustancia preparada como arriba descrito con 4 a 8 unidades de glucosa se somete a este procedimiento liofilizándose solamente los eluados neutralizados, se obtienen las siguientes fracciones superiores individuales:

20 $n_1 + n_2 = 4$ = 67.000 AIE/mg
 $n_1 + n_2 = 5$ = 57.000 AIE/mg
 $n_1 + n_2 = 6$ = 42.000 AIE/mg
 $n_1 + n_2 = 7$ = 24.000 AIE/mg
 $n_1 + n_2 = 8$ = 5.000 AIE/mg

25 Ejemplo 18

El procedimiento de degradación de β -amilasa arriba descrito se realiza como sigue.

100 mg de compuesto se disuelven en 1,9 cc de tampón

de acetato sódico 20 mM (pH 4,75) y se mezcla con 0,1 cc de β -amilasa de batata (BOEHRINGER; 5 mg/cc; 500 E/mg). La mezcla se mantiene durante 48 horas a 37°C y se calienta durante 5 minutos a 100°C y a continuación se centrifuga a 4500 rpm para retirar la albúmina precipitada y otras impurezas. Toda la mezcla se aplica entonces en una columna con bio-gel P-2 (diámetro 22 mm; 100 cm de longitud; termoestabilizado a 65°C) y se eluye con agua a una velocidad de flujo de 25 cc/hora. El eluado se conduce a través de un conductómetro y un refractómetro altamente sensible con cubetas de paso. Se recogen fracciones de cada vez 2,5 cc. Las fracciones se pueden comprobar con respecto a su actividad inhibidora de amilasa o de sacarasa o mediante el ensayo antranónico respecto a su contenido en carbohidrato. Los electrolitos que provienen del tampón y el preparado enzimático se eluyen con el volumen en exceso y los productos de degradación con peso molecular decreciente. La separación total de los compuestos, cuyo peso molecular se diferencia poco, se efectúa por recycling chromatography bajo las condiciones arriba descritas. Las fracciones, que contienen los productos a aislar se reúnen y se liofilizan.

Ejemplo 19

Para la separación de los compuestos isómeros con 3 unidades de glucosa se aplican 10 g de una mezcla de isómeros disuelta en agua sobre una columna llenada con Dowex[®] 50 W x 4 (H⁺). La columna se lava primeramente con agua hasta que el eluado está neutro y después se eluye con ácido clorhídrico 0,025-n. Se recogen fracciones de cada vez 3 cc y se comprueban por cromatografía de capa delgada. La cromatografía de capa delgada se efectúa en placas de gel de sílice silanizadas (MERCK, República Federal Alemana) con 100 : 60 : 40 : 2 de acetato de etilo + metanol + agua + 25 % de amoníaco en triple revelado.

El compuesto de fórmula IV recorre una mayor distancia desde el punto de partida que el compuesto de fórmula V. La fracción 215 hasta 272 conteniendo los 6 g de isómeros con la fórmula V y las fracciones 288 hasta 294, que contienen los 600 mg de isómero con la fórmula IV, se reúnen, se neutraliza con Amberlite IRA 410 (OH⁻) y se concentra.

La actividad inhibidora de sacarasa in vitro de los isómeros de fórmula IV aislados según este procedimiento es de 19.000 SIE/g.

10 Ejemplo 20

Preparados adecuados de los compuestos con $n_1 + n_2 \geq 4$ se pueden obtener por cromatografía de permeación de gel circular (recycling gel permeation chromatography) según el siguiente ejemplo:

15 6,0 g del preparado en bruto obtenido según el ejemplo 8 ó 17 de compuestos con $n_1 + n_2 = 4$ y 5 se liberan de las mezclas de sal por disolución del material en amoníaco 1 nM y aplicación de esta solución en una columna (diámetro 50 cc; longitud 100 cm) llenada con Sephadex G-10[®]. La columna se eluye con amoníaco 1 nM y el eluado se vigila con ayuda de un refractómetro de flujo y de un conductómetro con una célula de paso. El eluado se puede comprobar también por cromatografía de capa delgada en placas de gel de sílice (n-butanol : etanol : agua = 45 : 35 : 20). Se recogen las fracciones, que contienen el material a purificar y se liofiliza (rendimiento: 4,4 g).

25 2,0 g de este material se aplica para ulterior separación en una columna (diámetro 50 mm; longitud 100 cm), llenada con bio-gel P-2[®], 200 a 400 mallas. La columna se termoestabiliza a 65^oC y se eluye con agua a una velocidad de flujo de 80 cc/h.

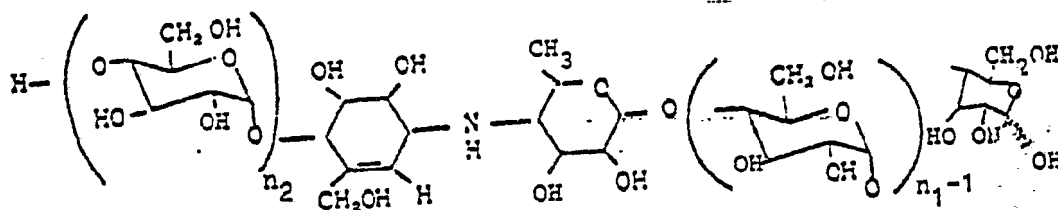
30

Las fracciones sin consumir y aquellas fracciones que contienen sal, que pudieran aún estar presentes después de la cromatografía de Sephadex, se desechan. El sistema, compuesto de columna, bomba de impulsión, refractómetro y conductómetro de flujo se cierra y la solución se conduce en circuito a través del gel. El progreso de la separación se comprueba mediante vigilancia constante del índice de refracción y de la conductibilidad. Se ha alcanzado una separación suficiente después de 5 circuitos. Se vuelve a conectar de nuevo la columna al depósito de reserva del disolvente y la columna se eluye reuniéndose en cada caso fracciones con un volumen de 16 cc. Las fracciones se comprueban por cromatografía de capa delgada como arriba descrito y se recogen las fracciones, que contienen los compuestos puros y las fracciones intermedias y se liofiliza. Rendimiento: 600 mg del compuesto con $n_1 + n_2 = 4$; 420 mg del compuesto con $n_1 + n_2 = 5$ y 100 mg de material menos separado de las fracciones intermedias.

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

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la preparación de amino-azúcares, de fórmula general:



5 en la que n_1 es un entero de 1 a 8 y n_2 es 0 o un entero de 1 a 8, de modo que $n_1 + n_2$ sea igual a 3 - 8, estando dicho compuesto sustancialmente libre de isómeros estructurales del mismo cuando $n_1 + n_2 = 3$ ó 4 y estando sustancialmente libre de compuestos homólogos de fórmula (I) cuando $n_1 + n_2 = 5$ ó más; caracterizado porque cepas del orden Actinomycetales, en especial de la familia Actinoplanaceae se cultivan aeróbicamente
10 en caldos nutrientes sólidos o líquidos, que contengan productos de partida para carbono y nitrógeno, así como sales, el caldo de fermentación se elabora y los compuestos individuales se separan y se aislan, y los miembros, en caso dado, de orden
15 mas alto de fórmula I, se degradan por hidrólisis química o enzimática.

2.- Procedimiento para preparar una composición farmacéutica, caracterizado porque comprende mezclar, como ingrediente activo, un compuesto de fórmula (I), con un diluyente
20 sólido o gaseoso licuado o con un diluyente líquido distinto a un disolvente de un peso molecular inferior a 200, excepto en presencia de un agente de superficie activa.

3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la composición se prepara en forma de una solución acuosa estéril o isotónica.
25

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el ingrediente activo se mezcla en una cantidad de 0,5 a 95 % en peso.

5.- Procedimiento para la preparación de amino-azúcares, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria, e ilustrado en los dibujos adjuntos.

Esta Memoria consta de 67 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 19 MAYO 1977

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

J. M. GOMEZ ACEBO Y POMBO
p. p. Firmado: L. Gaeta Fernández

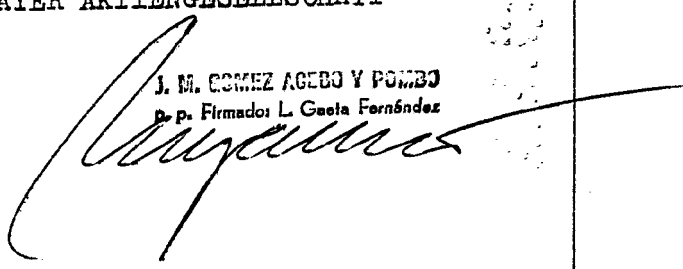
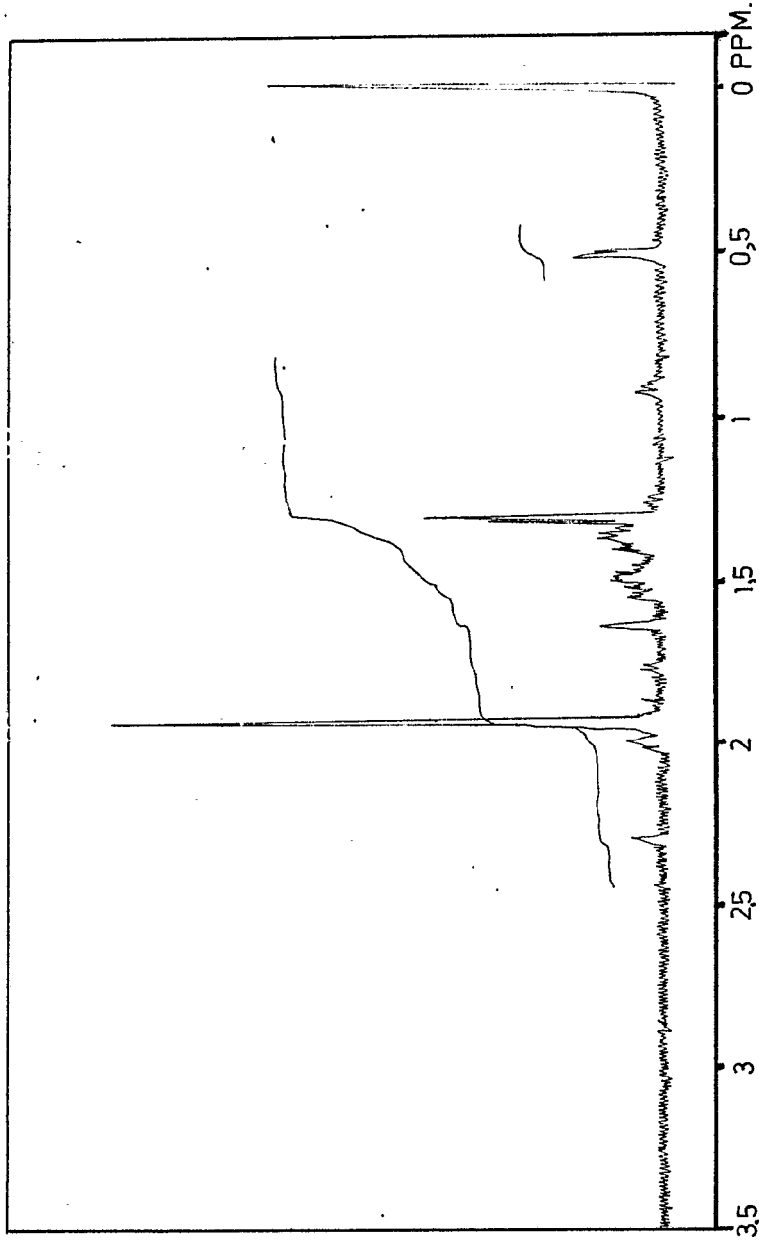


FIG.1

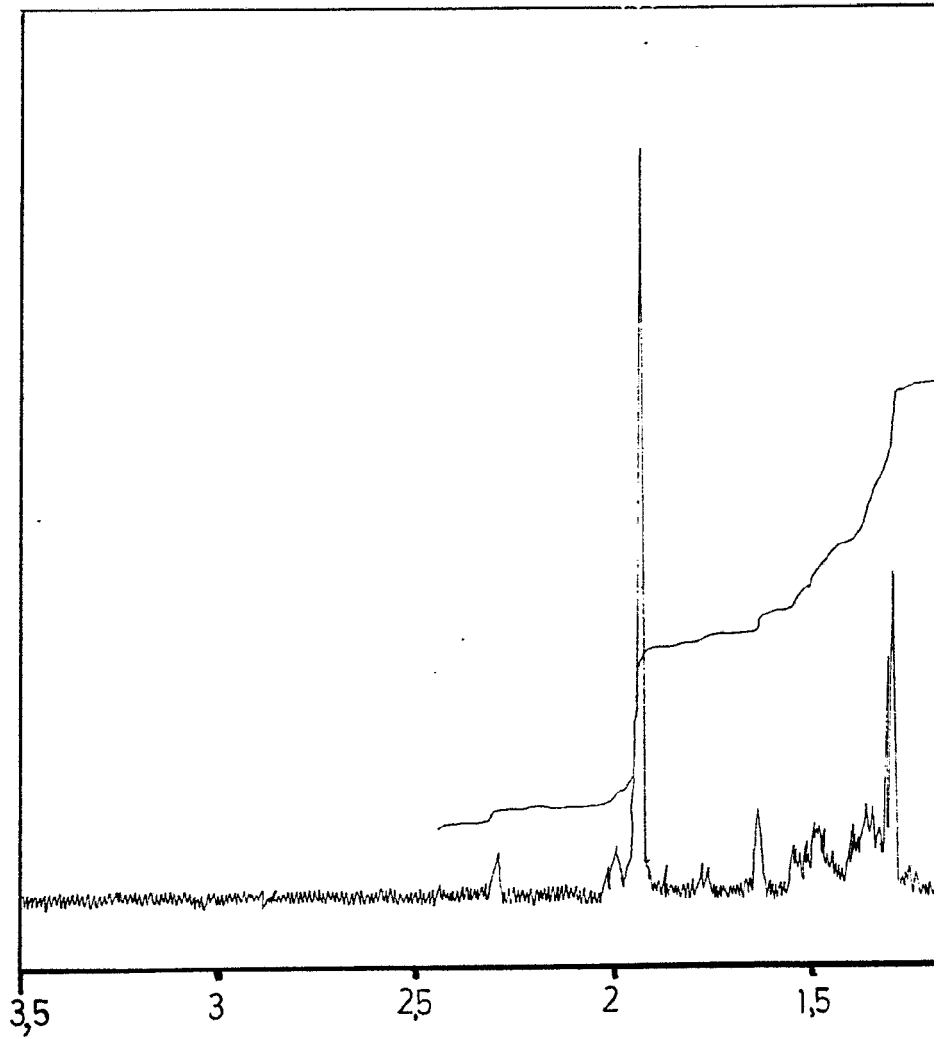


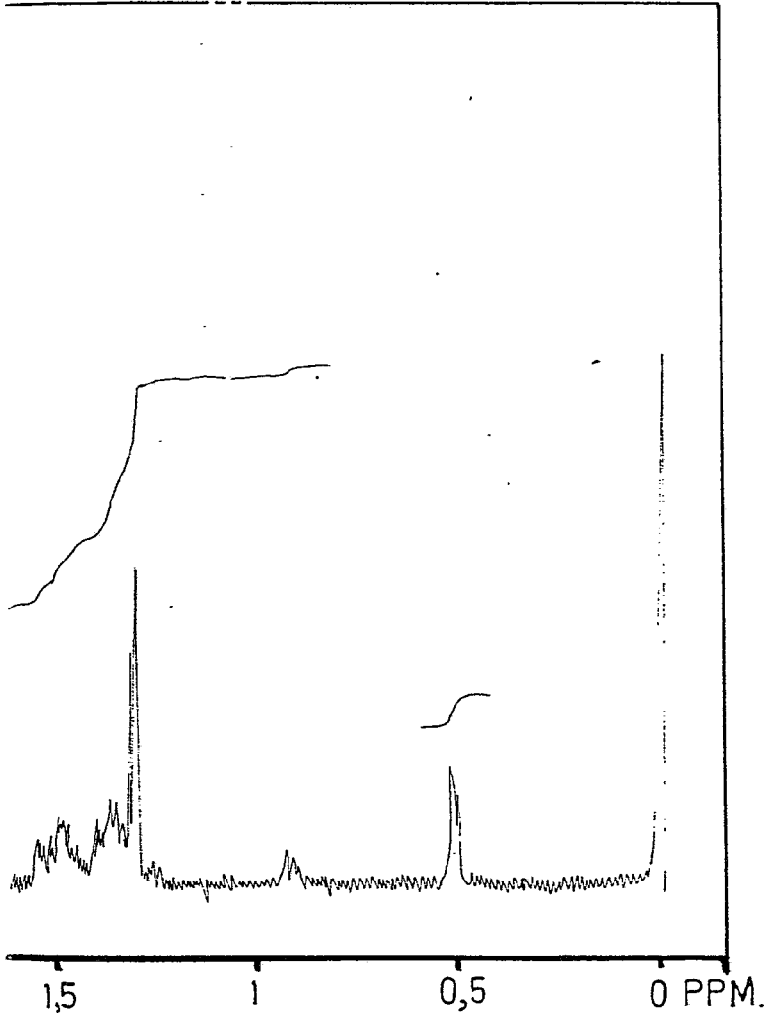
ESCALA
VARIABLE

1957-1958

Dr. P. Filippidis, L. G. G. Fernández

FIG.1



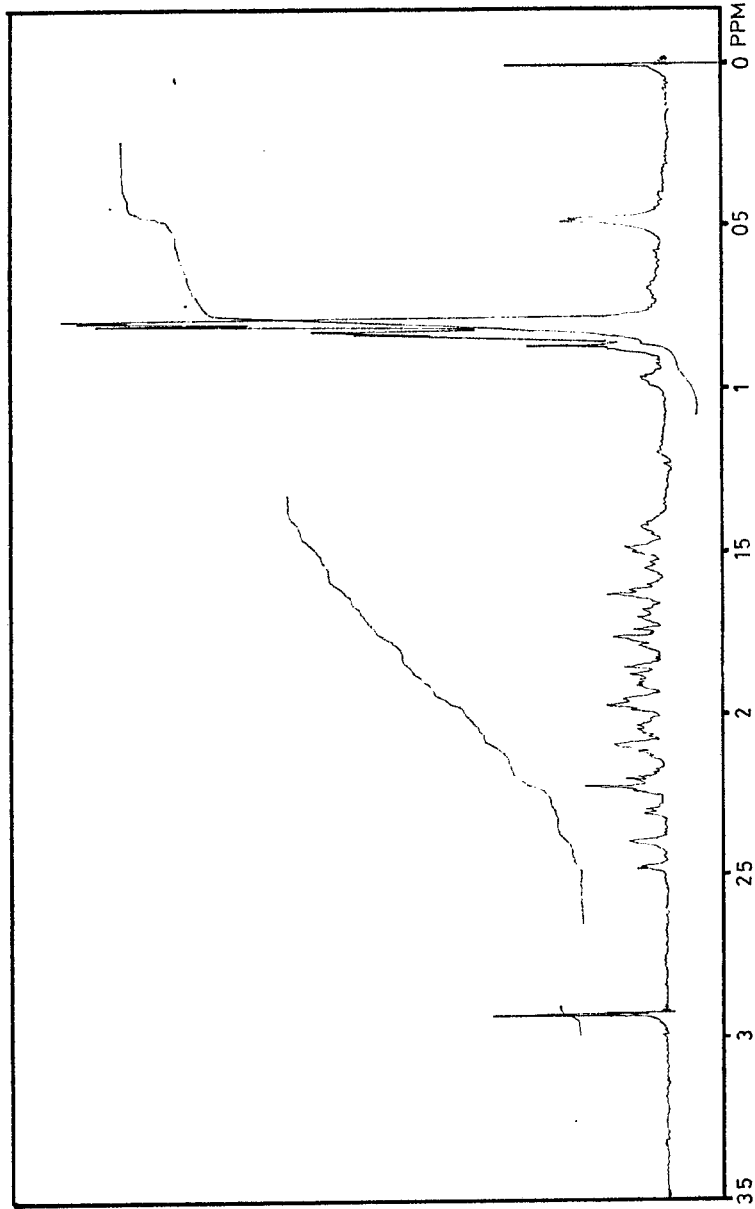


ESCALA
VARIABLE

~~Madrid 19 Mayo 1977~~

p. p. Firmado: L. Gaeta Fernández

FIG. 2



ESCALA
VARIABLE
MAY 19 1977

MADRID

Centro de Estudios Científicos y Tecnológicos

de la Universidad Complutense de Madrid

Departamento de Química Orgánica

Sección de Química Orgánica

Sección de Química Orgánica

Sección de Química Orgánica

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

FIG. 2

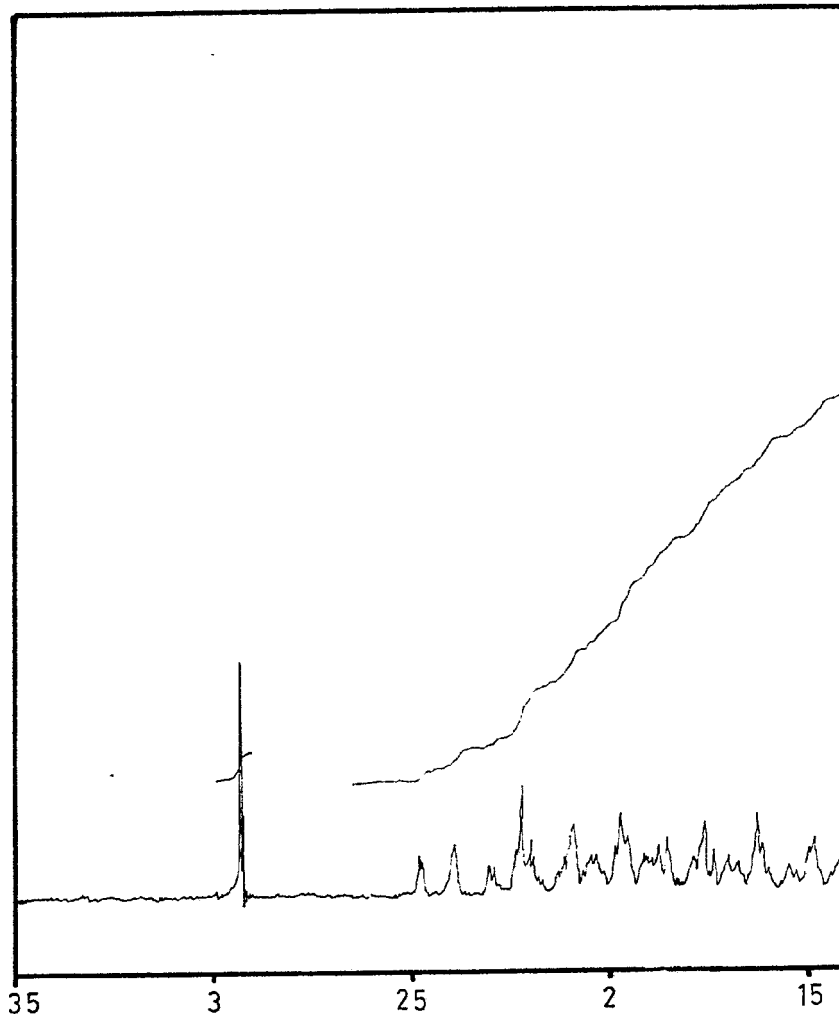
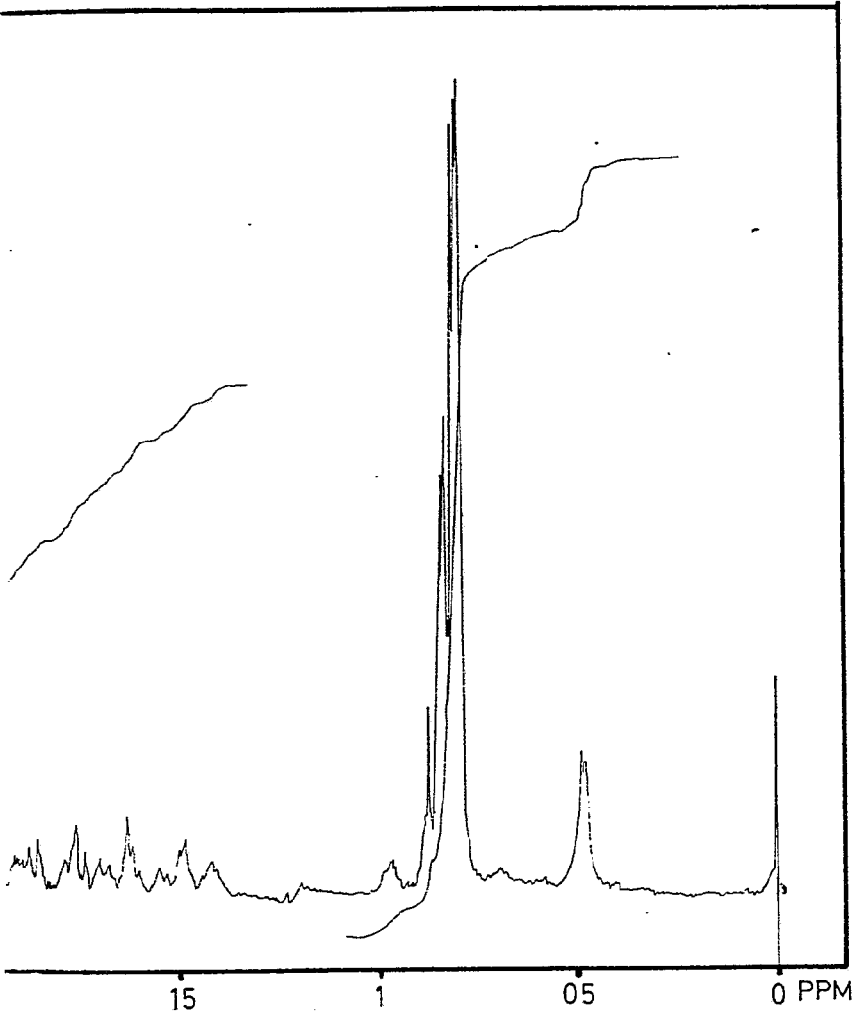


FIG. 2



ESCALA
VARIABLE

19 MAYO 1977

Mauricio

Dr. P. Firmado: L. Geets Escobedo

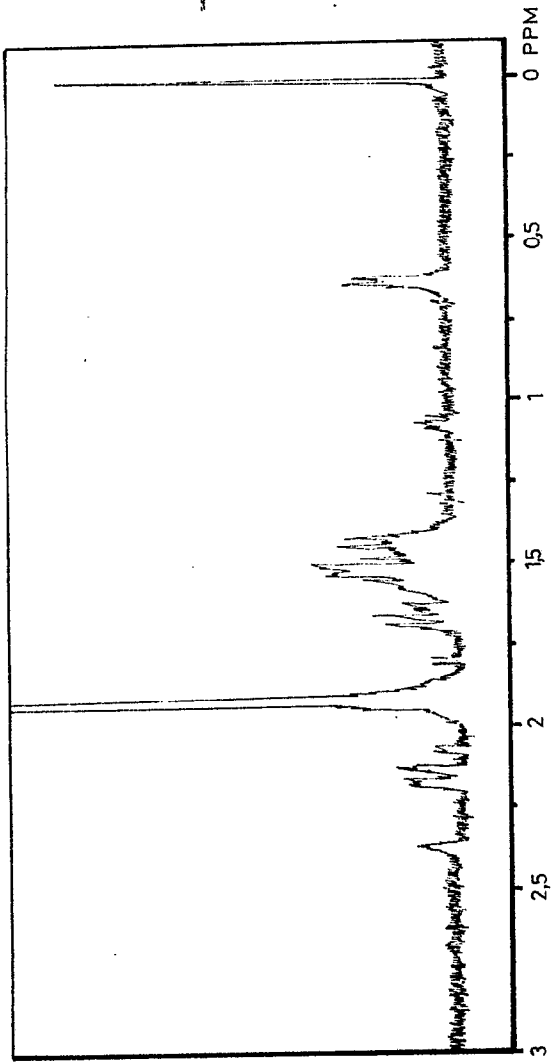


FIG. 3

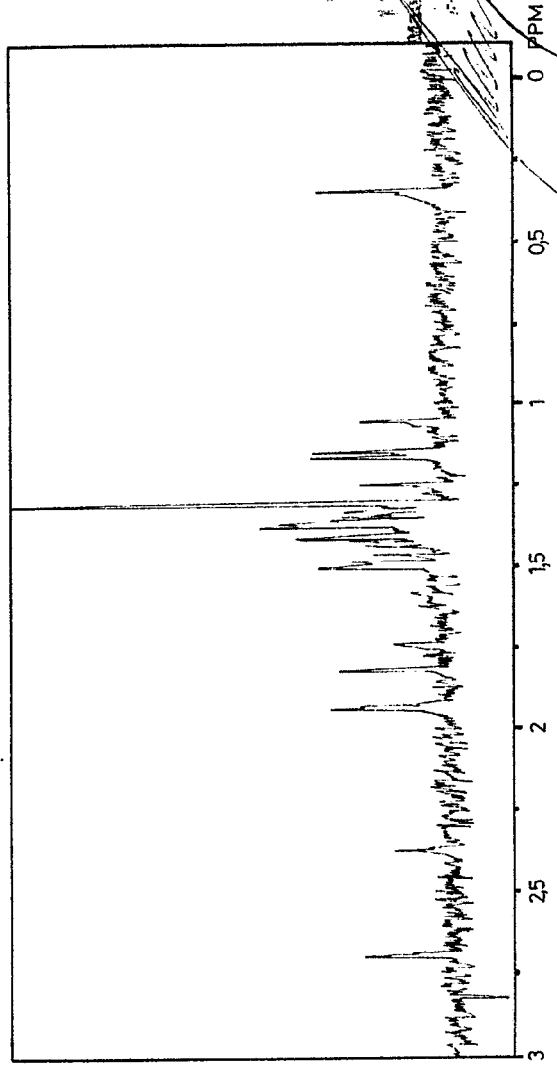


FIG. 4

15 MAY 1977
Dr. P. Ferrero
G. S. S. S.

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

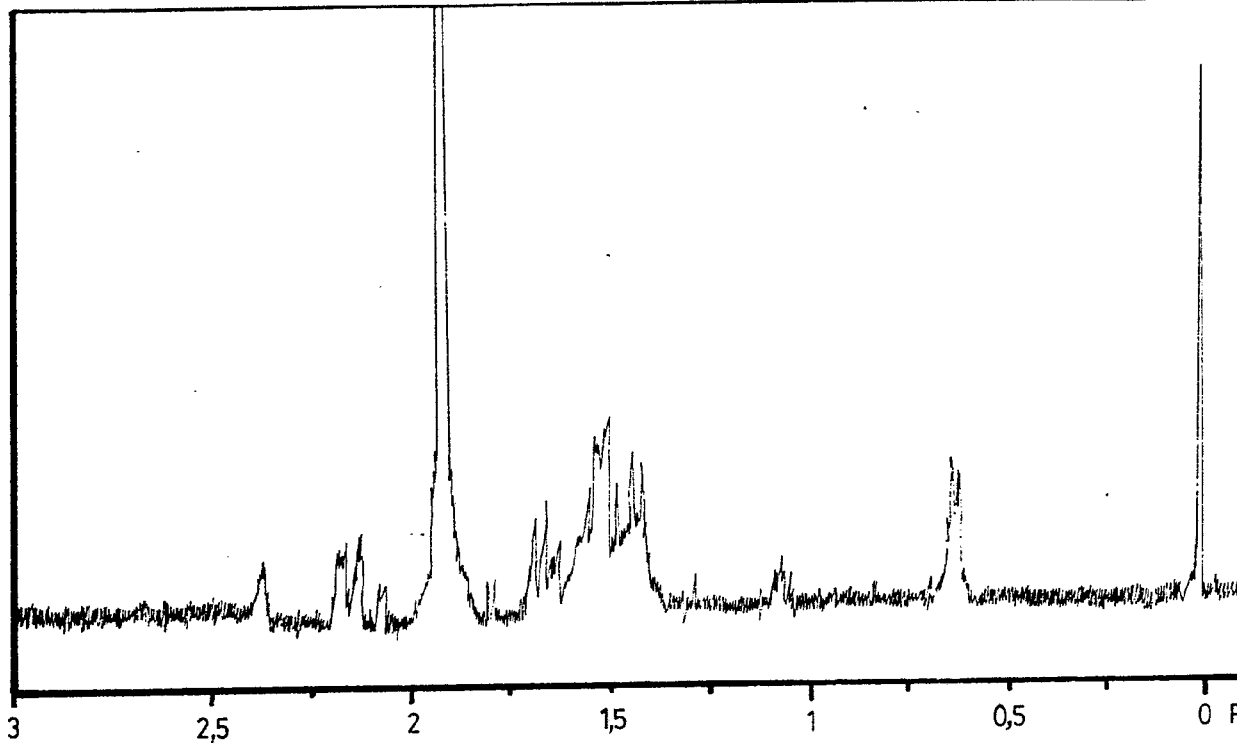
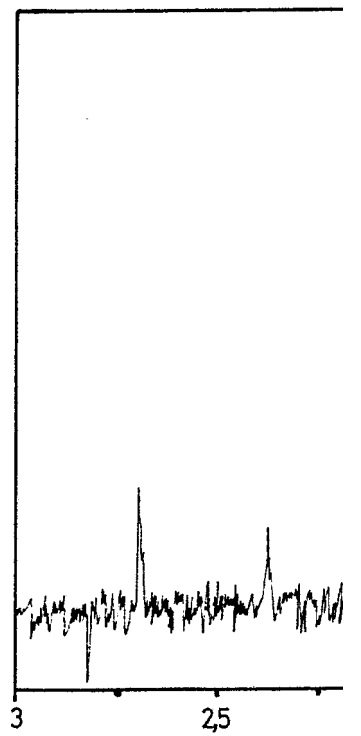


FIG. 4



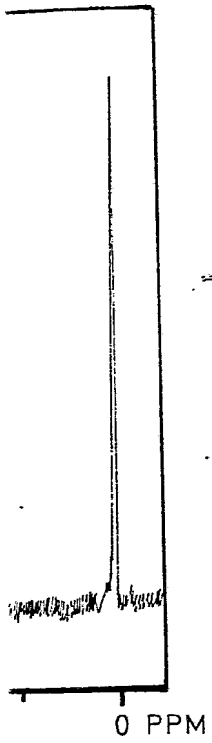
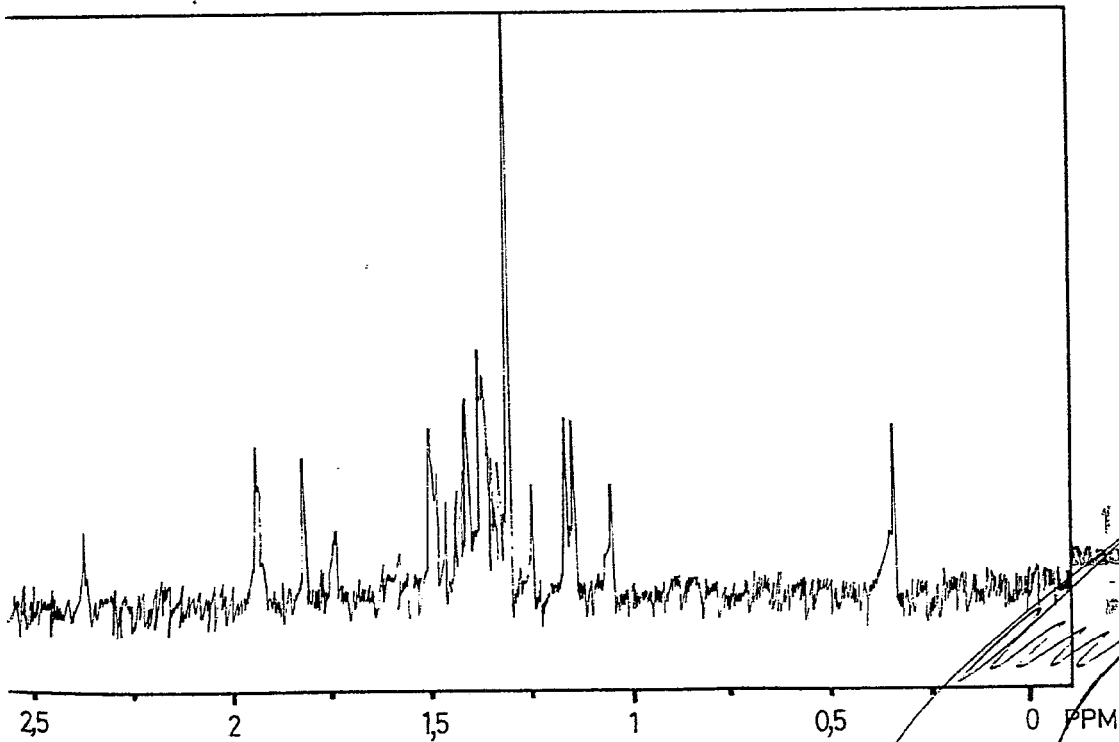


FIG. 3



ESCALA
VARIABLE
19 MAYO 1977

Por Firmados L. Garcia Ferrandiz

A handwritten signature in dark ink, written over the printed text and extending across the bottom of the spectrum.