

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedida en virtud de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y en el contenido de la memoria adjunta.

19 ES	11	NUMERO	21	465.339	10 AI
	22	FECHA DE PRESENTACION		18 AGO. 1978	

20 OCT. 1978

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
P 26 58 563.7	23 de Diciembre de 1976	República Federal Alemana
P 27 26 899.1	15 de Junio de 1977	República Federal Alemana

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07G; C12K; A61K	

64 TITULO DE LA INVENCION

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE INHIBIDORES PARA GLICOSIDOHIDROLASAS

71 SOLICITANTE (ES)

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Leverkusen-Bayerwerk, República Federal Alemana

72 INVENTOR (ES)

Werner Frommer, Lutz Müller, Delf Schmidt, Walter Puls, Hans-Peter Krause
Ulrich Heber

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

GOMEZ-ACEBO

Es conocido que un número de la familia de los actinomicetos, ante todo las actinoplanaceas son inhibidores para las glicosidohidrolasas, preferentemente las enzimas disociadoras de carbohidrato del tracto digestivo (publicación alemana DOS 2.064.092).

5 Asimismo es conocido que la nojirimicina, un antibiótico de efecto bacterioestático de las cepas de la clase *Streptomyces*, inhiben ciertas α -glucosidasas microbiales (T. NIWA et al. Agr. Biol. Chem. 34, 966 (1970)).

10 La presente invención se refiere a inhibidores para glicosidohidrolasas, en especial inhibidores de glucosidasa, que actúan en el tracto digestivo. Estos inhibidores están formados por organismos de la familia Bacillaceae, especialmente por cepas de la clase *Bacillus*. Además, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen éstos inhibidores como sustancias acti-
15 vas, así como a procedimientos para el control e influenciación del metabolismo de carbohidrato en el ser humano y en los animales por inhibición de las glicosidohidrolasas con ayuda de éstas sustancias activas.

20 Para hallar cepas adecuadas se emplean los métodos descritos a continuación.

De muestras de tierra se aíslan en forma conocida cepas de la familia Bacillaceae, especialmente aquellas de la clase *Bacillus*. Mediante inoculación de éstas cepas se inyectan
25 matraces de cultivo con soluciones nutrientes que permiten el crecimiento de éstas cepas. Se puede emplear, por ejemplo, una solución nutriente que contenga 5 g de peptona y 3 g de extracto de carne por litro, pero fundamentalmente se pueden emplear sin embargo muchos otros tipos de caldos de cultivo que contengan fuentes de carbono y de nitrógeno adecuadas, así como sales nutrientes. El pH de las
30 soluciones nutrientes puede variar entre amplios límites; preferente-

mente se selecciona un pH inicial en la solución nutriente entre 6,0 y 8,0.

5 Como suministrador de carbono para las soluciones nutrientes entran en consideración las más distintas sustancias orgánicas. Como ejemplos sean mencionados los carbohidratos, los ácidos orgánicos y alcoholes.

Como fuente de nitrógeno se pueden emplear el extracto de levadura, harina de soja, peptonas, extracto de carne y muchas otras sustancias orgánicas.

10 La concentración de las fuentes de carbono y de nitrógeno, así como de las sales nutrientes, de las cuales sean mencionadas como ejemplo, FeSO_4 , CaCO_3 y MgSO_4 , pueden oscilar entre amplios límites. En algunos casos hasta se puede prescindir de una adición independiente de sales nutrientes, ya que frecuentemente
15 están contenidas como mezclas en las fuentes de nitrógeno complejas.

Como la formación de los inhibidores depende frecuentemente en gran escala de la composición de los caldos nutrientes se recomienda cultivar las cepas, para optimar el rendimiento
20 de la producción, en distintos caldos de cultivo. Propositiones correspondientes figuran en los ejemplos.

Del caldo de cultivo se llenan, por ejemplo, 100 - 200 cc en un matraz de Erlenmeyer de un litro de capacidad, se esteriliza en forma conocida, se inyecta con la cepa a comprobar
25 y el matraz se incuba a 15 - 80°C, preferentemente a 24 - 40°C ó bien 50 - 70°C en los bacilos termófilos, en máquinas agitadoras. Sí el cultivo presenta un crecimiento, lo que se puede apreciar por lo general después de 1 - 10 días, en la mayoría de los casos después de 1 - 5 días, se toma una muestra de, por ejemplo, 5 cc y en
30 ésta muestra se separan las células por filtración ó centrifuga-

ción. De los caldos de cultivo se emplean 1 - 100 μ l en los ensayos descritos a continuación y se calcula la capacidad inhibidora por cc.

Las células se extraen dos veces, cada una con 5 volúmenes (referido al volumen de las células) de acetona y a continuación una vez con 5 volúmenes de dietiléter. Los extractos reunidos se concentran hasta sequedad, se recogen en agua y se liofiliza. Los liofilizados se emplean en concentraciones de 10 - 1000 μ g/cc en los ensayos descritos a continuación.

Ensayo de amilasa

Una unidad de inhibidor de amilasa (1 AIE) se define como la cantidad de inhibidor que inhibe dos unidades de amilasa en un 50 %. Una unidad amilasa (AE) es la cantidad de enzima que en un minuto, bajo las condiciones de ensayo indicadas más abajo, disocia un μ - equivalente de enlaces glucosídicos en la fécula. Los μ - equivalentes (μ Val) de enlaces disociados se determinan colorimétricamente con ácido dinitrosalicílico como μ - equivalentes de azúcar reductora formada y con ayuda de una curva standard de maltosa se indican como μ - equivalentes de maltosa. Para la realización del ensayo se mezclan 0,1 cc de solución de amilasa (20 - 22 AE/cc) con 10 - 1000 μ g de inhibidor ó 1 - 100 μ l del caldo de cultivo a comprobar con 0,4 cc de tampón de glicerofosfato-sódico 0,02 M / 0,001 M de CaCl_2 a un pH de 6,9 y se equilibra durante unos 10 - 20 minutos en un baño María de 35°C. Después se incuba a 35°C durante 5 minutos con 0,5 cc de una solución de fécula al 1 % previamente calentada 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 revelar el 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 blanco, sin amilasa, que ha sido correspondientemente preparado. Para la evaluación se lee la actividad de amilasa que aún queda efectiva después de la adición del inhibidor de una curva standard de amilasa que ha sido previamente registrada y de ésta valor se calcula el porcentaje de inhibición de la amilasa empleada. El porcentaje de inhibición se registra como función del cociente

$$\frac{\mu\text{g de inhibidor} \times}{\text{AE} \times \times}$$

\times referido a la sustancia seca

$\times \times$ AE en el preparado sin inhibir de la misma serie

de la curva se lee el punto de inhibición del 50 % y se transforma en AIE/mg de inhibidor.

Ensayo de sacarasa

Una unidad inhibidora de sacarasa (SIE) se define como la cantidad de inhibidor que inhibe en un 50 % dos unidades de sacarasa. Una unidad de sacarasa (SE) es la cantidad de enzima que en 1 minuto, bajo las condiciones de ensayo indicadas más abajo, disocia 1 μMol de sacarosa en glucosa y fructosa. Los μMoles de glucosa formada se determinan cuantitativamente con ayuda de la reacción de glucoséoxidasa bajo condiciones en las cuales ya no se presenta ninguna 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 del cerdo según B. Borgström, A. Dahlquist, Acta. Chem. Scand. 12, (1958), página 1997. Diluida con 0,1 M de tampón

de maleinato sódico del pH 6,0 a correspondiente contenido de SE), con 1 - 20 μ g de inhibidor ó 1 - 20 μ l de la solución a comprobar y se completa con 0,1 M de tampón de maleinato sódico del pH 6,0 a 0,1 cc. 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 0,1 M de tampón de maleinato sódico del 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 glucosaoxidasasa (el reactivo de glucosaoxidasasa se obtiene por disolución de 2 mg de glucosaoxidasasa (Fa. Boehringer, grado de pureza I) en 100 cc de tampón 0,565 M de tris-HCl del pH 7,0 y adición a continuación de 1 cc de solución de detergente (2 g de tritona X 100 + 8 g de etanol al 95 % 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 Boehring, 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 a 545 nm se mide con respecto a un valor en blanco correspondiente. Para la evaluación se calcula el porcentaje de inhibición de la sacarasa empleada y del punto de inhibición del 50 % se transforma con ayuda de una curva standard de glucosa en SIE/g ó bien SIE/litro.

Ensayo de maltasa

Una unidad de inhibidor de maltasa (MIE) se define como la cantidad de inhibidor que inhibe en un 50 % dos unidades de maltasa. Una unidad de maltasa (ME) es la cantidad de enzima que en 1 minuto y 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 glucosaoxidasasa bajo condiciones bajo las cuales ya no se presente ninguna ulterior disociación de maltosa por la maltasa. Para

la realización del ensayo se mezclan 0,05 cc de una solución de maltasa ajustada 0,060 - 0,070 ME (maltasa solubilizada de mucosa de intestino delgado del cerdo según B. Borgström, A. Dahlquist, Acta Chem. Scand. 12 (1958), página 1997. Diluida con tampón 0,1 M de maleinato sódico del pH 6,0 al correspondiente contenido en ME) con 1 - 20 μ g de inhibidor ó 1 - 20 μ l de la solución a comprobar y se completa con tampón 0,1 M de maleinato sódico del pH 6,0 a 0,1 cc. Se equilibra durante 10 minutos a 35°C y después se mezcla con 0,1 cc de una solución 0,05 M de maltosa previamente calentada a 35°C en tampón 0,1 M de maleinato sódico del pH 6,0. Se incuba durante 20 minutos a 35°C y la reacción de maltasa se para mediante adición de 1 cc de reactivo de glucosa oxidasa y se incuba durante otros 30 minutos a 35°C. Después se agrega 1 cc de H₂SO₄ al 50 % y a 545 nm se mide contra un valor en blanco correspondiente.

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

Según el método arriba descrito se comprobaron una serie de cepas de la familia Bacillaceae. Aquí se hallaron, especialmente en las cepas de la clase Bacillus unas claras actividades inhibidoras de la glicosidohidrolasa. Respecto al rendimiento demostraron ser especialmente ventajosas las clases B. subtilis, B. subtilis var. niger, B. amyloliquefaciens, B. longisporus, B. polymyxa así como B. coagulans.

La frecuencia con la que según el método indicado se hallaron cepas que demostraron ser inhibidores activos en el ensayo fue superior al 5 %. Ejemplos de cepas especialmente eficaces se señalan en la tabla 1:

TABLA 1: Cepas Bacillus con efecto inhibidor de sacarasa

<u>Clase</u>	<u>Cepa N°</u>
<u>B.subtilis</u>	DSM 704
<u>B.subtilis var. niger</u>	DSM 675 (ATCC 9372)
<u>B.amyloliquefaciens</u>	DSM 7 (ATCC 23 350)
<u>B.coagulans</u>	DSM 1 (ATCC 7050)
<u>B.longisporus</u>	DSM 479*
<u>B.polymyxa</u>	DSM 365
<u>B.polymyxa</u>	DSM 372
<u>B.polymyxa</u>	DSM 742
<u>B.polymyxa</u>	DSM 292
<u>B.polymyxa</u>	DSM 356 (ATCC 8523)
<u>B.polymyxa</u>	DSM 36 (ATCC 842)
<u>B.polymyxa</u>	DSM 740
<u>B.polymyxa</u>	DSM 741
<u>B.subtilis</u>	DSM 1060
<u>B.subtilis</u>	DSM 1061
<u>B.subtilis</u>	DSM 1062
<u>B.subtilis</u>	DSM 1063
<u>B.subtilis</u>	DSM 1064
<u>B.subtilis</u>	DSM 1065
<u>B.subtilis</u>	DSM 1066
<u>B.subtilis</u>	DSM 1067

* también inhibe la amilasa

Las cepas mencionadas están depositadas bajo los números DSM indicados en la "Deutschen Sammlung für Mikroorganismen" (DSM), Göttingen de donde se pueden obtener.

5 Las cepas DSM 704, 740, 741 y 742 se describen en la tabla 2; las restantes cepas se conocen por la literatura y se mencionan en "Catalogue of Strains 1974" del DSM.

10 Para la obtención de los inhibidores de glicosidohidrolasas se cultivan las cepas arriba mencionadas en las soluciones nutritivas arriba descritas. Aquí se ha de observar que prácticamente cada cepa precisa para la producción óptima una solución nutritiva de distinta composición, tanto cualitativa como cuantitativamente.

15 Después de una incubación durante 1 - 10 días a 15 - 80°C, preferentemente 24 - 40°C ó bien en los termófilos 50 - 70°C, en matraces agitadores ó en fermentadores de distinto tamaño se separan las células de la solución nutritiva y según la presencia de los inhibidores se enriquece el principio eficaz de la solución nutritiva y/ó de las células.

20 De los caldos de cultivo se obtienen los inhibidores por liofilización ó precipitación con sales ó disolventes orgánicos hidrosolubles (tal como, por ejemplo, alcoholes inferiores y cetonas) ó por adsorción de las sustancias activas en intercambiadores de iones.

25 De las células se obtienen los inhibidores por extracción con disolventes orgánicos tales como, por ejemplo, alcoholes, cetonas, éteres, ésteres y sulfóxidos.

30 Para ello se centrifuga el preparado de fermentación a 3000 - 20 000 rpm, preferentemente 6 - 10 000 rpm, durante 10 - 60 minutos, preferentemente 30 minutos, ó se filtra, preferentemente bajo presión y con ayuda de agentes auxiliares de filtración

y de ésta manera se separa en caldo de cultivo y residuo de células.

TABLA 2

Propiedades de las células	DSM 740	DSM 741	DSM 742	DSM 704
Barritas longitud μ	3-6	2-5	3-7	2-4
Anchura μ	0,6-0,8	0,6-0,8	0,7-0,8	0,6-0,8
Gram-reacción	+	±	±	+
Esporas				
Elipsoide/cilíndrica	+	+	+	+
Redonda	-	-	-	-
Terminal/subterminal	+	+	+	+
Central/paracentral	+	+	+	+
Célula madre de esporas				
hinchada	+	+	+	-
Movilidad	+	+	+	+
Temperatura de crecimiento máxima				
Crecimiento positivo a °C	40	40	45	55
Crecimiento negativo a °C	45	45	50	60
Cetalasa	+	+	+	+
Crecimiento anaeróbico	+	+	+	-
Reacción de Voges-Proskauer	+	+	+	+
pH en el medio VP	6,2	6,5	6,5	5,6
Reacción de yema de huevo	-	-	-	-
Crecimiento				
pH 5,7	+	+	+	+
NaCl. 5 %	±	-	-	+
NaCl 7 %	-	-	-	+

TABLA 2 (continuación)

Propiedades de las células	DSM 740	DSM 741	DSM 742	DSM 704
NaCl 10 %	-	-	-	+
Lisocima (0,001 %)	-	+	-	-
Formación de ácido de				
D-glucosa	+	+	+	+
L-arabinosa	+	+	+	+
D-xilosa	+	+	+	+
D-manita	+	+	+	+
Formación de gas de la celulosa	+	+	+	-
Degradación de				
Fécula	+	+	+	+
Caseina	+	+	+	+
Gelatina	+	+	+	+
Tirosina	-	-	-	-
Hipurato	-	-	-	-
Pectina	+	+	+	
Evaluación de				
Citrato	-	-	-	+
Propionato	-	-	-	-
Desaminación de fenilalanina	-	-	-	
Reducción de NO ₃ a NO ₂	+	+	+	+
Formación de gas del nitrato	-	-	-	-
Formación de dextrinas cristalinas	-	-	-	
Indol	-	-	-	-
Dihidroxiacetona	+	+	-	

Las cepas DSM 740, DSM 741, DSM 742 y DSM 704 se adjudican debido a la formación de esporas y crecimiento aeróbico a la clase de los Bacillus. Las características morfológicas y fisiológicas determinadas en las cepas DSM 740, DSM 741 y DSM 742 corresponden a aquellas de Bacillus polymyxa mientras la cepa DSM 704 se adjudica a la clase de Bacillus subtilis.

La identificación se efectúa según las indicaciones de R. E. Gordon, W. C. Haynes, C. Hor-Nay Pong: The Genus Bacillus, Washington 1973.

El aislamiento del inhibidor del caldo de cultivo correspondiente se puede efectuar de distintas formas:

- a) Concentración de los caldos de cultivo a presión más reducida (10 - 50 Torr) a temperaturas del baño de 20 - 100°C, preferentemente 40 - 80°C, a 1/5 - 1/50 del volumen inicial. El extracto concentrado se filtra ó se centrifuga y el filtrado claro (lo sobrenadante claro) se liofiliza, en caso dado previa desalación.
- b) Precipitación de los inhibidores del caldo de cultivo (ó de los caldos de cultivo concentrado según a)), mediante adición de disolventes orgánicos hidrosolubles, tales como por ejemplo, alcoholes ó cetonas, preferentemente metanol, etanol, acetona, hasta un contenido de un 60 - 90 %. Como con reducida concentración en disolventes se precipitan sustancias acompañantes inactivas, éste procedimiento de precipitación es especialmente adecuado para la precipitación fraccionada para la separación de materiales concomitantes indeseados.
- c) Precipitación como sal de los inhibidores de los extractos

(ó de los extractos concentrados según a)), por ejemplo, con sulfato amónico, sal común, etc. El precipitado obtenido se recoge por centrifugación ó filtración y se lava bien directamente con acetona y éter y se seca en vacío ó se dializa y liofiliza después de volver a disolver en agua.

5

- d) Adsorción de los inhibidores en intercambiadores de iones. Este procedimiento es adecuado para el aislamiento de aquellos inhibidores que debido a su naturaleza química lleven cargas. La desorción del inhibidor se realiza mediante variación de la fuerza iónica ó del valor pH del medio eluyente.

10

Además del inhibidor se encuentran en los caldos de cultivo frecuentemente sustancias concomitantes indeseadas. La separación de éstos materiales concomitantes se puede realizar de distinta forma, por ejemplo, por desnaturalización bajo calor de las sustancias acompañantes en los inhibidores que son estables al calor ó por diálisis a través de membranas correspondientes en los inhibidores de bajo peso molecular donde los materiales concomitantes son retenidos por la membrana, ó por precipitación fraccionada (véase b) ó por adsorción de los materiales concomitantes en intercambiadores de iones.

15

20

El aislamiento de los inhibidores de las células se efectúa por repetida extracción de las células con disolventes orgánicos, preferentemente dos extracciones durante 10 - 20 minutos con 3 - 5 volúmenes de acetona (referido al volumen de las células húmedas) y a continuación una extracción durante 5 - 10 minutos con éter. Los extractos acetónicos y etéricos se concentran en vacío hasta sequedad, se recogen en agua y se liofilizan.

25

30

Las nuevas sustancias se disuelven bien en agua.

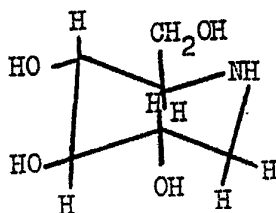
Un grupo de los inhibidores es estable al calor bajo valores pH neutros, estable a los ácidos (pH 2), estable a los alcalis (pH 12) y dializable. Estos inhibidores no son desactivados por la tripsina y pepsina, por su parte no inhiben las enzimas mencionadas. No se pueden teñir con los colorantes proteínicos típicos. Según las estimaciones por la filtración del gel se encuentra el peso molecular de éstos inhibidores por encima de 100 pero por debajo de 2000.

Los mejores inhibidores de éstos grupos se caracterizan por una actividad inhibidora con respecto a la sacarasa extremadamente alta que supera a la de todos los inhibidores de sacarasa hasta ahora conocidos.

En la fermentación de la cepa DSM 7 en una solución nutriente de la composición A (véase el ejemplo 4) se obtienen, después de una fermentación durante 4 días más de 400 000 SIE/l, en un cultivo de ésta cepa en solución nutriente S₃ (véase el ejemplo 3) se obtienen después de una fermentación durante 6 días más de 300 000 SIE/l.

Por adsorción en intercambiadores de cationes fuertemente ácidos en forma H⁺ y desorción a continuación con solución acuosa de NH₃ así como concentración y liofilización del desorbato se obtiene un inhibidor en bruto con aproximadamente 40 000 SIE/g. La extracción del inhibidor en bruto con metanol, concentración del extracto hasta sequedad, disolución en agua y cromatografía de la solución acuosa en intercambiadores débilmente ácidos a base de dextrano ó celulosa, especialmente celulosa carboximetilica, desorción con ácidos minerales diluidos, preferentemente ácido clorhídrico 10⁻³ - 10⁻¹ - n, concentración de las fracciones activas inhibidoras de la sacarasa y liofilización de éstas fracciones, conduce a un producto en bruto enriquecido con aproximadamente 250 000 SIE/g. La cromatografía del producto en bruto enriquecido

en dextrano modificado (Sephadex[®] LH 20) en metanol, concentración de las fracciones activas inhibitoras de la sacarasa y adición de ácidos minerales concentrados, preferentemente ácido clorhídrico concentrado, hasta un pH de 1 - 3 suministra un producto cristalino con 540 000 SIE/g. Esta sustancia es cromatográficamente pura. Como fórmula de sumas se determinó $C_6H_{13}O_4N$ ó bien $C_6H_{14}O_4NCl$ para el hidrocloreuro. En base de sus parámetros físicos (espectros IR, RMN, UV; punto de fusión, rotación específica) y las propiedades químicas (oxidación de periodato, análisis elemental) es idéntica al compuesto descrito por S. INOYE et al. (Tetrahedron 23, 2125 (1968)) de la fórmula de sumas $C_6H_{13}O_4N$ ó bien $C_6H_{14}O_4NCl$ para el hidrocloreuro, a la que los autores adjudican la fórmula estructural



y para la que se ha propuesto el nombre "1-desoxinojirimicina".

Este compuesto se obtuvo por los autores por vía química por hidrogenación del antibiótico nojirimicina. El producto de partida nojirimicina se obtiene según T. NIIDA et al. (J. Antibiotics, Ser. A. 20, 62 (1967)) por fermentación de los organismos de la clase Streptomyces.

Mediante la presente invención resulta por primera vez posible obtener la desoxinojirimicina en un solo proceso de trabajo por síntesis microbiológica directa con buenos rendimientos, sin el rodeo a través de la nojirimicina relativamente inestable y por ésta razón difícil de manipular.

Es extraordinariamente sorprendente y no era de

preveer que se produjesen estos compuestos de organismos de la clase Bacillus, ya que éstos microorganismos por lo general son menos adecuados como productores de materiales secundarios y en el mejor de los casos forman sustancias secundarias esencialmente en forma de péptidos.

Además, por las distintas cepas, por ejemplo, DSM 372, se forman inhibidores de sacarasa que en mezcla, adicionalmente a la desoxinojirimicina y/ó nojirimicina, también producen otros componentes que tienen acción inhibidora de sacarasa, lo que se puede diferenciar claramente en un cromatograma de capa delgada.

Otras cepas, por ejemplo, DSM 741, forman inhibidores que en el cromatograma de capa delgada no permiten apreciar ninguna desoxinojirimicina ó nojirimicina, y que por lo tanto son de otra estructura química.

Es sabido que en los animales y en los seres humanos después de la ingestión de alimentos y bebidas que contengan carbohidratos (por ejemplo, fécula de trigo, fécula de patata, fruta, zumos de fruta, cerveza, chocolate) se presentan hiperglicemias que se producen debido a una rápida degradación de los carbohidratos por las glicosidohidrolasas (amilasas de la saliva y del páncreas, maltasas, sacarasas) según el siguiente esquema.

Fécula ó bién glicógeno $\xrightarrow{\text{Amilasa}}$ Maltosa $\xrightarrow{\text{Maltasa}}$ Glucosa

Sacarosa $\xrightarrow{\text{Sacarasa}}$ Glucosa + Fructosa

Estas hiperglicemias tienen un carácter particularmente fuerte 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 aumento de la síntesis

de grasa y un decrecimiento de la degradación de grasa. A continuación de tales hiperglicemias se presenta en las personas adiposas de metabolismo sano frecuentemente una hipoglicemia debido a la secreción de insulina. Es sabido que tanto las hipoglicemias como también la pulpa de alimento que queda en el estómago fomenta la producción de jugos gástricos que, a su vez, inicia ó fomenta la formación de una gastritis, de un Ulcus ventriculi ó duodeni.

Asimismo es conocido que en la cavidad oral se disocian los carbohidratos, especialmente la sacarosa por los microorganismos fomentandose así la formación de caries. La mala absorción de carbohidratos, por ejemplo, Debido a una deficiencia de sacaras intestinal ocasiona diarreas. Dosis adecuadas de un inhibidor de glucosidasa producen una mala absorción artificial y por lo tanto son adecuadas a contrarestar una obstipación.

Los inhibidores de la presente invención son por lo tanto adecuados como agentes terapéuticos para las siguientes indicaciones:

Adiposidad, hiperlipoproteinemia, aterosclerosis, diabetes, pre-diabetes, gastritis, obstipación, caries.

Para ensanchar el espectro de actividad puede ser recomendable combinar inhibidores para glicosidohidrolasas que se complementen en su efecto, bien sea en combinación de los inhibidores según la presente invención entre sí ó en combinaciones de los inhibidores según la presente invención con otros ya conocidos. Así, por ejemplo, puede ser conveniente combinar los inhibidores de sacaras de la presente invención con inhibidores de amilasa ya conocidos.

En algunos casos son también ventajosas las combinaciones de los inhibidores de la presente invención con anti-diabéticos orales conocidos (derivados de sulfonilúrea β -citotrópicos

y/ó biguanidas de actividad glucémica), así como con sustancias reductoras del lípido sanguíneo, tales como, por ejemplo, clofibrato nicotínico, colestiramina y otros.

5 Los compuestos se pueden aplicar sin diluir, por ejemplo, como polvos ó en un revestimiento de gelatina ó en combinación con un excipiente, en una composición farmacéutica.

Los preparados farmacéuticos pueden contener una cantidad mayor ó menos del inhibidor, por ejemplo, 0,1 % hasta 99,5 % en combinación con un excipiente inerte, farmacéuticamente compatible, no tóxico, pudiendo contener el excipiente uno ó varios diluyentes sólidos, semisólidos ó líquidos, materiales de carga y/ó agentes auxiliares de formulación no tóxicos, inertes y farmacéuticamente compatibles. Tales preparados farmacéuticos se presentan preferentemente en forma de unidades de dosificación, es decir, unidades físicamente discretas, conteniendo una cantidad determinada del inhibidor, que corresponde a una fracción ó a un múltiplo de la dosis que corresponde para provocar el efecto inhibidor deseado. Las unidades de dosificación pueden contener 1, 2, 3, 4 ó más dosis individuales ó 1/2, 1/3, 1/4 de una dosificación 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 ó varias unidades de dosificación, el efecto inhibidor deseado, administrándose una dosis total, media, ó 1/3, ó 1/4 de la dosis diaria generalmente 1, 2, 3 ó 4 veces al día. También se pueden ingerir otros medios terapéuticos. Sí bien la dosificación y el esquema de dosificación debiera calibrarse cuidadosamente en todos los casos, empleando el juicio del especialista y teniendo en consideración la edad, el peso y el estado del paciente, la clase y la gravedad de la enfermedad, la dosificación se encontrará generalmente en un margen entre unos 30 hasta

10
15
20
25
30

3×10^5 AIE/kg y entre 1 hasta 1×10^4 SIE/kg de peso corporal por día. En algunos casos se alcanzará un efecto terapéutico suficiente con una dosis inferior, mientras en otros casos será necesaria una dosis superior.

5 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.

10 Los polvos se preparan desmenuzando de las sustancias a un tamaño adecuado y mezclandolas con un excipiente farmacéutico asimismo desmenuzado. Si bien para ésta finalidad se emplea un carbohidrato comestible, tal como, por ejemplo, fécula lactosa, sacarosa ó glucosa y que también se puede emplear aquí, es deseable utilizar un carbohidrato no metabolizable, tal como por ejemplo, un
15 derivado de celulosa.

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

20 Las cápsulas se pueden obtener por preparación de la mezcla pulverulenta arriba descrita y llenado en cápsulas de 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 ó polietilenglicol sólido. La mezcla se puede mezclar asimismo con
25 un desintegrador ó facilitador de la disolución, tal como por ejemplo, agar-agar, carbonato de calcio ó carbonato sódico, para mejorar, al ingerir las cápsulas, la accesibilidad del inhibidor.

 La preparación de las tabletas se efectua, por ejemplo, preparando una mezcla de polvos, basta ó fina y adición de
30 un lubricante desintegrador. De ésta mezcla se forman tabletas. Una

mezcla pulverulenta se prepara mediante mezcla de la sustancia, que se desmenuzó en forma adecuada, y se complementa con un diluyente u otra sustancia excipiente arriba descrita. En caso dado, se agrega un aglutinante, por ejemplo celulosa carboximetilica, alginatos, 5 gelatina ó polivinilpirrolidonas, un retardador de la disolución, tal como, por ejemplo, una sal cuaternaria y/ó un agente de adsorción, tal como, por ejemplo, bentonita, caolína ó fosfato dicálcico. La mezcla pulverulenta se puede granular junto con un aglutinante, tal como, por ejemplo, jarabe, pasta de fécula, mucosa de acacia ó 10 soluciones de materiales de celulosa ó polímeros. Después se pasa el producto a través de un tamíz basto. Como alternativa se puede pasar la mezcla pulverulenta a través de una máquina tableteadora y desmenuzar los trozos en forma desigual, que se obtienen a una granulometría determinada. Para que los gránulos formados no se queden 15 atascados en las toberas formadoras de las tabletas, se pueden dotar de un lubricante, tal como, por ejemplo, ácido esteárico, sal de estearato, talco ó aceite mineral. Esta mezcla lubricada se puede prensar entonces a tabletas. Las sustancias activas se pueden reunir también con excipientes inertes de libre fluidez y llevarse direc- 20 tamente a forma de tabletas bajo alimentación de las etapas de granulación y desmenuzación. El producto se puede dotar de un revestimiento claro u opaco, por ejemplo, un revestimiento de laca, un revestimiento de azúcar ó sustancias polímeras ó de un revestimiento de cera pulido. A éstos revestimientos se les pueden agregar colo- 25 rantes para poder hacer diferencias 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 también en unidades de dosificación, de manera que una can- 30 tidad de preparado determinada contenga una cantidad determinada

de sustancia activa. El jarabe se puede preparar disolviendo la sustancia activa en una solución acuosa que contenga 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 pueden agregar facilitadores de la disolución y agentes de emulsión, tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados y ésteres de sorbita polioxi-
5 etilida, agentes de conservación, aditivos mejoradores del sabor, tales como, por ejemplo, aceite de menta ó sacarina y similares.

10 Sobre la cápsula se pueden indicar prescripciones de dosificación. Además, la dosificación se puede asegurar de manera que la sustancia activa sea cedida con retraso, por ejemplo, manteniendo la sustancia activa en sustancias polímeras, ceras ó similares.

15 Adicionalmente a las composiciones farmacéuticas arriba mencionadas, se pueden preparar también alimentos conteniendo éstas sustancias activas; por ejemplo, azúcar, pan, productos de patata, zumos de frutas, carveza, chocolate y otros artículos de pastelería y conservas, tales como, por ejemplo, mermeladas, agregan-
20 dose a éstos productos una cantidad terapéuticamente eficaz de, como mínimo, uno de los inhibidores de la presente invención.

Los inhibidores de la presente invención muestran, además, la propiedad de influenciar en los animales la proporción de la grasa indeseada con respecto a la proporción de la carne magra deseada. Esto es de especial importancia para la cría y mantenimiento
25 de los animales útiles en la agricultura, por ejemplo, para el cebado de cerdos, pero también de considerable importancia para la cría y el mantenimiento de otros animales útiles y de adorno. El empleo de inhibidores puede conducir, además, a una considerable ra-
30 cionalización de la alimentación de los animales, tanto temporal,

cuantitativa, como también cualitativamente. Como producen un cierto retraso de la digestión se prolonga el tiempo de residencia de los alimentos en el aparato digestivo con lo que es posible una alimentación ad libitum combinada con menos gastos. Además, al emplear los inhibidores de la presente invención, se logra en muchos casos un ahorro considerable, en proteínas alimenticias costosas.

Las sustancias activas se pueden emplear, por lo tanto, prácticamente en todos los terrenos de la alimentación animal como medio para reducir la formación de grasas, así como para ahorrar albúminas alimenticias.

La eficacia de las sustancias activas es aquí ampliamente independiente de la clase y del sexo de los animales. Las sustancias activas demuestran ser especialmente valiosas en las clases de animales que, en general, ó en determinadas etapas de vida tiendan a la formación de grasas.

Como animales en los cuales se pueden emplear los inhibidores para la reducción de la formación de grasas y/ó para ahorrar albúminas alimenticias, sean mencionados los siguientes animales útiles y de adorno: Los seres de sangre caliente, tales como reses, cerdos, caballos, ovejas, cabras, gatos, perros, conejos, animales de piel, tales como, por ejemplo, visón, chinchilla, otros animales de adorno tales como, por ejemplo, cobayas y hamster, animales de laboratorio y zoológicos, por ejemplo, ratas, ratones, monos, etc. aves, por ejemplo, gallinas, gansos, patos, pavos, palomas, papagayos y canarios y seres de sangre fría, tales como peces, por ejemplo, carpas y reptiles, por ejemplo. serpientes.

La cantidad de la sustancia activa que se administra a los animales, para alcanzar el efecto deseado se puede variar ampliamente debido a las favorables propiedades de las sustancias activas. Se encuentra preferentemente entre 0,5 mg hasta 2,5 g, espe-

cialmente 10 hasta 100 mg/kg de pienso. La duración de la administración puede ascender desde pocas horas ó días hasta varios años. La cantidad adecuada de sustancia activa, así como la duración de la administración, están en estrecha relación con la meta de la alimentación. Dependien especialmente de la clase, de la edad, del sexo, del estado de salud y la forma de mantenimiento de los animales y se determina fácilmente por el especialista.

Las sustancias de la presente invención se administran a los animales según métodos usuales. La forma de la administración, depende especialmente de la clase, del comportamiento y del estado general de los animales. Así se puede efectuar la administración una vez al día ó varias veces diarias, en periodos regulares ó irregulares, por vía oral. Por razones de conveniencia se dará en la mayoría de los casos, preferencia a la administración oral, especialmente al ritmo de la ingestión de alimentos y/ó de bebidas por los animales.

Las sustancias activas se pueden administrar como sustancias puras ó en forma formulada, entendiendose por forma formulada, tanto como mezclas previas, es decir en mezclas con excipientes inertes no tóxicos de clase arbitraria, así como también como parte de una ración total en forma de una mezcla al pienso, por ejemplo, como componentes de mezcla de un pienso mixto solo. Está incluida también la aplicación de preparados adecuados a través de agua de beber.

Las sustancias activas se pueden administrar, en caso dado, en forma formulada, también con otras sustancias alimenticias y sustancias activas, por ejemplo, sales minerales, elementos en huellas, vitaminas, albúminas, portadores de energía (por ejemplo, fécula, azúcar, grasas), colorantes y/ó sazonantes u otros aditivos a los piensos, tales como, por ejemplo, fomentadores del crecimiento.

Las sustancias activas se pueden administrar a los animales antes, durante ó después de la administración de los alimentos.

Se recomienda la administración oral junto con los alimentos y/ó el agua de beber, agregandose, según las necesidades, las sustancias activas a la cantidad total ó solo a partes del pienso y/ó del agua.

Las sustancias activas se pueden agregar según métodos usuales por simple mezcla como sustancia activa, preferentemente en forma finamente repartida ó en forma formulada en mezcla con excipientes comestibles, no tóxicos, en caso dado, también en forma de una mezcla previa ó de un concentrado de pienso, al pienso y/ó al agua.

El pienso y/ó el agua de beber puede contener las sustancias activas de la presente invención en una concentración de un 0,001 hasta 5,0 %, especialmente un 0,02 hasta 2,0 % (en peso). El nivel óptimo de la concentración de la sustancia activa en el pienso y/ó en el agua de beber depende especialmente de la cantidad de recepción de pienso y/ó de agua por los animales y se puede determinar, facilmente por el especialista.

La clase del pienso y su composición no tienen aquí importancia. Se puede emplear todas las composiciones de piensos usuales, comerciales ó especiales que contengan preferentemente un equilibrio de sustancias enérgicas y albúminas e inclusive vitaminas y materiales minerales, necesarios para una alimentación equilibrada. El pienso se pueden componer, por ejemplo, de materias vegetales, por ejemplo, salvados de tortas de aceite, salvados de trigo, productos secundarios del trigo, pero también de heno, piensos fermentados, remolachas y otras plantas alimenticias de sustancias animales, por ejemplo, productos cárnicos y de pescado, harina de huesos, grasas, vitaminas, por ejemplo, complejo A, D, E, K y B, así

como fuentes de proteínas especiales, por ejemplo, levaduras, así como determinados aminoácidos y sustancias minerales y elementos en huellas, tales como, por ejemplo, fósforo y hierro, zinc, manganeso, cobre, iodo, etc.

5 Las mezclas previas pueden contener preferentemente un 0,1 hasta 50 %, especialmente 0,5 hasta 5,0 % (en peso) de las sustancias activas de fórmula II junto con excipientes comestibles arbitrarios y/o sales minerales, por ejemplo, cal alimenticia ácido carbónica y se preparan según métodos de mezcla usuales.

10 Los piensos mixtos contienen preferentemente un 0,001 hasta 5,0 %, especialmente 0,02 % (en peso) de las sustancias activas de fórmula II, junto con los componentes de materias previas usuales para un pienso mixto, por ejemplo, salvados ó productos secundarios del trigo, salvados de torta de aceite, albúmina animal, 15 minerales, elementos en huellas y vitaminas. Se pueden obtener según los métodos de mezcla usuales.

Preferentemente en las mezclas previas y en los agentes para los piensos mixtos, se pueden proteger las sustancias activas en caso dado, por agentes adecuados que recubran su superficie, por ejemplo, con ceras no tóxicas ó gelatinas, contra el aire, 20 la luz y/o la humedad.

Ejemplo para la composición de un pienso mixto terminado para aves, que contiene una sustancia activa según la presente invención:

25 200 g de trigo, 340 g de maiz, 360,3 g de salvado de soja, 60 g de sebo de vaca, 15 g de fosfato dicálcico, 10 g de carbonato cálcico, 4 g de sal común iodada, 7,5 g de mezcla de vitamina mineral, y 3,2 g de mezcla previa de sustancia activa, dan después una mezcla cuidada, 1 kg de pienso.

30 La mezcla de vitamina mineral se compone de:

6000 I.E. de vitamina A, 1000 I.E. de vitamina D₃, 10 mg de vitamina E, 1 mg de vitamina K₃, 3 mg de riboflavina, 2 mg de piridoxina, 20 mg de vitamina B₁₂, 5 mg de pantotenato de calcio, 30 mg de ácido nicotínico, 200 mg de cloruro quinolínico, 200 mg de MnSO₄ x H₂O, 5 140 mg de ZnSO₄ x 7H₂O, 100 mg de FeSO₄ x 7H₂O y 20 mg de CuSO₄ x 5H₂O.

La mezcla previa de sustancia activa contiene, por ejemplo, l-desoxinojirimicina en la cantidad deseada, por ejemplo, 1600 mg y adicionalmente, 1 g de DL-metionina, así como tanta harina 10 de soja, de manera que se forme una mezcla previa de 3,2 g.

Ejemplo para la composición de un pienso mixto para cerdos que contiene una sustancia activa de fórmula I:

630 g de salvado de trigo para la alimentación (compuesto de 200 g de salvado de maíz, 150 g de salvado de cebada, 150 g de salvado de 15 avena y 130 g de salvado de trigo), 80 g de harina de pescado, 60 g de salvado de soja, 58,8 g de harina de tapioca, 38 g de levadura de cerveza, 50 g de mezcla de vitamina mineral para cerdos (composición, por ejemplo, como para el alimento de pollos), 30 g de harina de torta de linaza, 30 g de pienso de glutén de maíz, 10 g de aceite de 20 soja, 10 g de melaza de caña de azúcar y 2 g de mezcla previa de sustancia activa (composición, por ejemplo, como para el pienso de pollitos) dan, después de cuidadosa mezcla 1 kg de pienso.

Las mezclas de pienso indicadas están destinadas preferentemente para la cría y cebado de pollitos ó bien de cerdos, 25 pero se pueden emplear en composición idéntica ó similar también para la cría y cebado de otros animales.

Como ya se ha mencionado se pueden emplear los inhibidores individualmente ó también en mezclas arbitrarias entre sí, empleandose tanto las sustancias activas puras como también las 30 sustancias activas crudas obtenidas en la preparación, en caso dado

después de una purificación en bruto.

Ejemplo 1

5 Si un matraz de Erlenmeyer de un litro de capacidad,
que contiene 120 cc de una solución nutriente de la composición

2,0 % de fécula de maiz

1,0 % de glucosa

0,5 % de hidrolizado de caseina

10 1,0 % de extracto de lavadura

pH ajustado con Na_2CO_3 a 7,2

+ 0,4 % de CaCO_3

esterilización 30' a 121°C

se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 704 y el
15 matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presenta
la solución de cultivo después de 5 días una actividad de 70 SIU/cc.

Ejemplo 2

20 Si un matraz de Erlenmeyer de un litro de capacidad,
que contiene 120 cc de una solución nutriente de la composición

7,5 % de extracto de malta

0,3 % de hidrolizado de caseina

0,7 % de extracto de levadura

25 0,3 % de CaCO_3

0,3 % de K_2HPO_4

agua de la red, esterilización 30' a 121°C

pH después de la esterilización ajustado con K_2CO_3 a 6,6 -

6,8

30 se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 704 y el ma-

traz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presenta la solución de cultivo después de 5 días una actividad de 197 SIE/cc.

Ejemplo 3 Solución nutriente S₃

5

Si un fermentador de 140 litros de capacidad que contiene 100 litros de solución nutriente de la composición

7,5 % de extracto de malta

0,3 % de hidrolizado de caseína

10

0,7 % de extracto de levadura

0,3 % de CaCO₃

0,3 % de K₂HPO₄

agua de la red, esterilización 30' a 121°C,

pH ajustado después de la esterilización con K₂CO₃ a 6,6 -

15

6,8

se inyecta con 1,2 litros de cultivo previo, obtenido por incubación de 10 matraces de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad cada uno con 120 cc de solución nutriente de la misma composición, inoculado con la cepa DSM 704 e incubado bajo agitación y ventilación durante 20 5 días a 28°C, se obtiene un caldo de cultivo que contiene 260 SIE/cc.

Ejemplo 4 Solución nutriente A

25

Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contiene 120 cc de una solución nutriente de la composición

3,0 % de harina de soja

3,0 % de glicerina

0,2 % de CaCO₃

agua de la red

30

esterilización 30' a 121°C

se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 7 y el matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presenta la solución de cultivo después de 4 días una actividad de 437 SIE/cc.

5 Ejemplo 5

Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad que contiene 120 cc de una solución nutriente según el ejemplo 1, se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 7 y el matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa presenta la solución de cultivo después de 5 días una actividad de 162 SIE/cc.

Ejemplo 6

15 Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contiene 120 cc de una solución nutriente de la composición

1,0 % de glucosa
1,0 % de fécula soluble
0,5 % de hidrolizado de caseína
20 0,75 % de extracto de carne
0,75 % de peptonas
0,5 % de extracto de levadura
0,1 % de K_2HPO_4
0,3 % de NaCl
25 0,1 % de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$
agua de la red,
pH ajustado con Na_2CO_3 a 7,2
esterilización: 30' a 121°C

se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 7 y el matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presenta la so-

lución de cultivo después de 5 días una actividad de 36,4 SIE/cc.

Ejemplo 7

5 Sí un matraz de Erlenmeyer de un litro de capacidad, que contiene 200 cc de una solución nutriente según el ejemplo 3, se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 7 y el matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa muestra la solución de cultivo después de 6 días una actividad de 224 SIE/cc.

10

Ejemplo 8

 Sí un fermentador de 140 litros de capacidad que contiene 100 litros de solución nutriente según el ejemplo 4, se inyecta con 1,2 litros de cultivo previo, obtenido por incubación de 10 matraces de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, cada uno con 120 cc de solución nutriente de la misma composición, inyectados con la cepa DSM 7 e incubados bajo agitación y ventilación durante 5 días a 28°C, se obtiene un caldo de cultivo que contiene 286 SIE/cc.

20

Ejemplo 9

 Sí un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 2, se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 1 y el matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presentará la solución de cultivo después de 6 días una actividad de 28,4 SIE/cc.

25

Ejemplo 10

5 Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad,
que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 1,
se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 365 y el
matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presenta-
rá la solución de cultivo después de 4 días una actividad de 15,6
SIE/cc.

10 Ejemplo 11

 Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad,
que contiene 120 cc de una solución nutriente según el ejemplo 2,
se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 365 y el
15 matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presentará
la solución de cultivo después de 4 días una actividad de 25,8 SIE/cc.

Ejemplo 12

20 Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad,
que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 4,
se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 741 y el
matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presentará
la solución de cultivo, después de 5 días, una actividad de 3,2 SIE/cc.

25

Ejemplo 13

 Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad,
que contiene 120 cc de una solución nutriente de la composición
30 según el ejemplo 1, se inyecta con una suspensión de esporas de la

cepa DSM 741 y el matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presentará la solución de cultivo después de 5 días una actividad de 26,4 SIE/cc.

5 Ejemplo 14

Sí un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contiene 120 cc de una solución nutriente de la composición según el ejemplo 2, se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 741 y el matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presentará la solución de cultivo después de 3 días una actividad de 24.0 SIE/cc.

Ejemplo 15

15

Sí un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad que contiene 120 cc de una solución nutriente de la composición

2,0 % de fécula de maiz

0,5 % de glucosa

20

0,3 % de hidrolizado de caseína

pH ajusta con Na_2CO_3 a 7,2

+ 0,4 % de CaCO_3

esterilización: 30' a 121°C

25

se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 741 y el matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa muestra la solución de cultivo, después de 2 días una actividad de 81,7 SIE/cc y después de 3 días una actividad de 121 SIE/cc.

Ejemplo 16

5 Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 4, se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 675 y el matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presentará la solución de cultivo después de 5 días una actividad de 8,6 SIE/cc.

Ejemplo 17

10

Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 1, se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 675 y el matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presentará la solución de cultivo después de 5 días una actividad de 53,0 SIE/cc.

15

Ejemplo 18

20

Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 2, se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 675 y el matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presentará la solución de cultivo después de 4 días una actividad de 17,8 SIE/cc.

25

Ejemplo 19

30 Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 4, se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 372 y el

matraz se incubaba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presentará la solución de cultivo, después de 5 días una actividad de 6,0 SIE/cc.

Ejemplo 20

5

Sí un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contiene 120 cc de solución nutriente, según el ejemplo 1, se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 372 y el matraz se incubaba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presentará la solución del cultivo, después de 4 días una actividad de 21,6 SIE/cc.

10

Ejemplo 21

Sí un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 2, se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 372 y el matraz se incubaba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, presentará la solución del cultivo, después de 3 días una actividad de 26,8 SIE/cc.

15

20

Ejemplo 22

Sí un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contiene 120 cc de una solución nutriente de la composición

25

2,0 % de fécula de maíz

1,0 % de glucosa

0,5 % de hidrolizado de caseína

0,5 % de extracto de levadura

pH ajustado con Na₂CO₃ a 7,2

30

+ 0,4 % de CaCO₃

esterilización: 30' a 121°C

se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 372 y el
matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa muestra en
la solución de cultivo después de 3 días una actividad de 26,5 SIE/cc.

5

Ejemplo 23

Sí un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad,
que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 22,
se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 479 y el
matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa muestra en
la solución de cultivo, después de 3 días una actividad de 7,9 SIE/cc.

10

Ejemplo 24

Sí un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad,
que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 6,
se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 36 y el
matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa muestra en
la solución de cultivo, después de 3 días una actividad de 5,4 SIE/cc.

15

20

Ejemplo 25

Sí un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad,
que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 2,
se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 36 y el
matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa muestra en
la solución de cultivo, después de 3 días una actividad de 5,4 SIE/cc.

25

Ejemplo 26

5 Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad,
que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 2,
se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 356 y el
matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, muestra
en la solución de cultivo, después de 3 días una actividad de
8,8 SIE/cc.

10 Ejemplo 27

 Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad,
que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 1,
se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 292 y el
15 matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, muestra
en una solución de cultivo, después de 3 días una actividad de
9,0 SIE/cc.

20 Ejemplo 28

 Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad,
que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 2,
se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 292 y el
matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, muestra
25 en una solución de cultivo, después de 3 días una actividad de
9,2 SIE/cc.

30 Ejemplo 29

 Si un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad,

que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 2, se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 742 y el matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, muestra en una solución de cultivo, después de 3 días una actividad de
5 9,8 SIE/cc.

Ejemplo 30

Sí un matraz de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contiene 120 cc de una solución nutriente, según el ejemplo 1,
10 se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 740 y el matraz se incuba a 28°C en una máquina agitadora rotativa, muestra en una solución de cultivo, después de 4 días una actividad de
5,7 SIE/cc.

15

Ejemplo 31

El caldo de fermentación de un fermentador de 100 litros, según el ejemplo 3, se ajusta con HCl semiconcentrado a un pH
20 de 3,0 - 3,5 y la masa de bacterias se separa por centrifugación después de flocular. Se obtienen 70 litros de solución de cultivo marrón oscuro con un contenido en SIE de 220 000 SIE/litro. Esta solución se vierte en una proporción de flujo de 20 l/h a través de una columna cargada con 12 kg de Lewatit^(R) SC 104 en forma H⁺
25 de 30 cm de diámetro. El permeado no tenía prácticamente ninguna actividad inhibidora de la sacarasa y se desechó. La columna se lavó con 50 litros de H₂O destilada (agua de lavado I), 20 litros de HCl 0,01 - n y a continuación nuevamente con 20 litros de H₂O destilada (agua de lavado II). Para la desorcpción de la actividad se
30 agregó un 2,5 % de amoniaco. Paralelo con la subida de la conductibi-

lidad del eluado y el incremento del coloreamiento marrón se eluye la actividad inhibidora de la sacarasa. El eluado previo (20 litros) hasta aumentar la conductibilidad se desecha, la fracción que contiene la actividad (35 litros) se concentra en el evaporar rotativo y se vuelve a disolver en poca agua (concentrado, 3 litros). El concentrado se liofiliza. Se obtienen 288 g de producto en bruto I marrón oscuro con 38 000 SIE/g.

Ejemplo 32

El caldo de fermentación de un fermentador de 100 litros, según el ejemplo 8, se ajusta con HCl semiconcentrado a un pH de 3,0 - 3,5 y la masa de bacterias se separa por centrifugación después de flocular. Se obtienen 60 litros de solución de cultivo marrón oscuro con un contenido de 240 000 SIE/litro. Esta solución se vierte en una proporción de flujo de 20 l/h a través de una columna de 30 cm de diámetro cargada con 12 kg de Dowex 50 W x 4 de la forma H⁺. El eluado no tenía prácticamente ninguna actividad inhibidora de la sacarasa y se desechó. La columna se lavó a continuación con 50 litros de agua destilada (agua de lavado I), 20 litros de HCl 0,01 - n y a continuación nuevamente con 20 litros de H₂O destilada (agua de lavado II). Para la desorcpción de la actividad se agregó ahora un 2,5 % de amoníaco. Paralelo con el aumento de la conductibilidad del eluado y el incremento del coloreamiento marrón se eluye la actividad inhibidora de la sacarasa. El eluado previo (20 litros) hasta subir la conductibilidad se desecha, la fracción que contiene la actividad (35 litros) se concentra en el evaporar rotativo y se vuelve a disolver en poca agua (concentrado, 3 litros). El concentrado se liofiliza. Se obtienen 360 g de producto en bruto I marrón oscuro con 24 000 SIE/g.

Ejemplo 33

50 g del producto en bruto I, del ejemplo 31, se molturan finamente en el mortero y a continuación se extrae 3 veces cada una con 300 cc de metanol industrial. Para ello se homogenizó el preparado primeramente durante 2 minutos en el homogenizador ultraturrax, después se introdujo en un baño María calentado a 40 - 50°C y se agitó durante 20 minutos. Después de cada extracción se pasó a través de un filtro de pliegues. El residuo que queda después de la tercera extracción en el filtro de pliegues se seca en vacío (28,4g). Como la comprobación demostró solo una actividad específica reducida de éste residuo, éste se desechó. Los extractos metanólicos se reunieron y se concentraron en vacío hasta sequedad. El residuo activo que queda en el matraz se disolvió en 750 cc de H₂O (L = 2,8 mS, pH = 7,2) y se pasó en una proporción de flujo de 500 cc/h a través de una columna 5 x 50 cm, llenada con CM.celulosa en forma H⁺ (CM-celulosa de la firma Whatman, tipo C 52). Se lavó ulteriormente con 5 litros de agua y a continuación se eluyó con 20 litros de HCl 0,002 - n. El permeado, el agua de lavado y el eluado se recogieron fraccionados en porciones de unos 0,5 l. La actividad inhibidora de la sacarasa se determinó y todas las fracciones que contenían más de 30 000 SIE/l se reunieron. En el permeado las fracciones 2 - 4 teñidas marrón oscuro y en el eluado amarillo claro las fracciones 16 - 35. Las fracciones reunidas se concentraron por evaporación y se liofilizaron. Se obtuvieron 18,2 g de una fracción de permeado 2 - 4 con una actividad específica de 4 000 SIE/g (desechada) así como 3,1 g del así llamado producto en bruto II con 250 000 SIE/g (aproximadamente 50 - 60 % puro). El producto en bruto II es fuertemente hidroscópico y se transforma en el aire en breve tiempo en una masa pegajosa.

Ejemplo 34

2,5 g del producto en bruto II del ejemplo 33, se disuelven, para separar la cantidad principal de los péptidos acompañantes, en 15 cc de metanol y se cromatografía a través de una columna 5 x 90 cm llena con Sephadex LH 20 en metanol. Con una proporción de flujo de 100 cc/h y una temperatura de 4 - 5°C se recogen las fracciones de 10 cc. 10 μ l de éstas fracciones se aplican sobre una placa de gel de sílice (firma Merck) y se comprobaron por cromatografía de capa delgada en el sistema etanol/25 % de $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O} = 80/10/10$. Las fracciones obtenidas por inhibidor DC se reúnen, se concentran a 5 - 10 cc y se vuelven a recromatografiar a través de la misma columna. Se analizan las fracciones en el DC y se reúnen las fracciones que contienen inhibidor recortándose solo un margen muy estrecho. Se concentra hasta sequedad. El inhibidor purificado con LH tiene así una pureza del 90 %. Para la separación de las últimas impurezas de péptido que quedan se recoge la sustancia que queda después de evaporar en un evaporador rotativo en 2 - 3 cc de metanol y la solución metanólica amarilla se mezcla con 50 μ l de HCl concentrado. Después de breve tiempo, en caso dado, también después de reposar durante varias horas, cristaliza el inhibidor en forma de cubos ó paralelepípedos ligeramente amarillentos. Los péptidos se quedan en la lejía madre. Los cristales se separan por centrifugación, se lavan una vez con metanol enfriado con hielo y el precipitado lavado se disuelve a continuación, bajo calentamiento, en 2 cc de metanol. Se agregan 4 cc de butanol y se deja reposar durante la noche a 4°C. Los cristales incoloros obtenidos a la mañana siguiente se separan por centrifugación, se lavan una vez con metanol enfriado con hielo, una vez con acetona y una vez

con éter y a continuación se secan en vacío. Rendimiento 460 mg, de inhibidor como hidrocloreuro con 540 000 SIE/g.

Ejemplo 35

5

Para demostrar los componentes inhibidores de la sacarasa en solución de cultivo ó producto en bruto se emplea también el siguiente procedimiento de cromatografía de capa delgada con reacción ezimática a continuación sobre la placa, que permite la demostración de los componentes inhibidores directamente sobre la placa. En ésta cromatografía de capa delgada se aplican 1 - 5 μ l de los caldos de fermentación ó 1 - 5 μ l de los preparados sobre placas terminadas de gel de sílice (firma Merck, tipo KG 60 F254) y se revela en etanol/ NH_3 / H_2O = 8/1/1 (I) ó acetato de etilo/metanol/agua = 10/6/4 (II).

15

Para hacer directamente visible los componentes inhibidores de la sacarasa se pulveriza la placa revelada y bién secada con gel de enzimas (20 cc / 20 x 20 cm placa) y se deja solidificar el gel. Se incuba previamente durante 5' en una cámara húmeda a temperatura ambiente y a continuación se pulveriza con gel de sustrato. Después de solidificar ésta segunda capa de gel se introduce la placa en una cámara húmeda y se incuba a 40°C. El teñido de inhibidor (manchas claras, fondo marrón rojizo) se revela en 60 - 90'. En el momento del desarrollo óptimo del color se interrumpe y la placa se seca con las capas de agar que se encuentran encima con aire caliente.

20

25

Preparación de los geles

30

Gel de enzima: 1,5 g de agarosa (L'Industrie Biologique Francais)

se suspende en 100 cc de tampón 0,2 - M de maleinato sódico del 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 5 agitación. Directamente antes de usar el gel se agrega 1 cc de reactivo GOD/POD (12,5 mg de glucosidasa, grado de pureza I, firma Böhlinger, número de orden 15423 y 2,5 mg de peroxidasa, grado de pureza II, firma Böhlinger, número de orden 15302, disueltos en 5 cc 10 de tampón de maleinato) y 4 - 5 unidades de sacarasa del intestino delgado del cerdo. El gel se ha de mantener hasta su pulverización a 50°C, 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 15 de maleinato sódico del pH 6,0 y se disuelve bajo hervor. A continuación se enfría a 50°C se mezcla con 100 μ l de tritón (2 g de Triton X - 100 + 8 g de etanol p.a.) y se agrega 1 g de sacarosa (Serva N° 35579) Después de disolverse la sacarosa el gel está listo para su uso.

20 La comprobación de las soluciones de cultivo de las cepas con éste método son componentes inhibidores de la sacarasa con los siguientes valores R_f del sistema I

Cepas	Valores R_f
DSM 7	0,25
25 DSM 741	0,25; 0,41; 0,50; 0,59; 0,71
DSM 704	0,25
DSM 372	0,25; 0,51; 0,60; 0,71

- 5
- 1,0 % de glucosa
 - 0,5 % de hidrolizado de caseina
 - 1,0 % de extracto de levadura
 - 0,1 % de K_2HPO_4
 - pH ajustado con Na_2CO_3 a 7,2
 - + 0,4 % de $CaCO_3$
 - esterilización: 30' a $121^\circ C$

se inyecta con una suspensión de esporas de la cepa DSM 372 y el
matraz se incuba a $28^\circ C$ en una máquina agitadora rotativa, presenta
10 la solución de cultivo después de 2,5 días una actividad de
50,3 SIE/cc.

Ejemplo 38

- 15
- Sí matraces de Erlenmeyer de 1 litro de capacidad
que contienen 120 cc de una solución nutriente de la composición
según los ejemplos 1, 2, 4 ó 6, se inyectan con suspensiones de
esporas de las cepas mencionadas y los matraces se incuban a $28^\circ C$ en
máquinas agitadoras rotativas, muestran las soluciones de cultivo
20 después de 4 días las siguientes actividades:

Cepa	Solución nutriente según ejemplo	Actividad de la solución de cultivo, después de 4 días en SIE/cc
------	-------------------------------------	--

KA - 63	4	31
"	1	6.6
"	6	25
"	2	7.9
IAM 1523	4	50
"	1	4.3
"	6	3.8
"	2	2.7
OUT 8108	4	8.4
"	1	3.6
"	2	3.1
OUT 8110	4	28
"	1	71
"	6	69
"	2	104
S 202	4	38
"	1	10.6
"	2	14.4
S 204	4	54
"	1	2.7
S 219	4	28
"	1	1.5
"	2	10.3
S 242	1	17
"	4	3.8
"	2	4.1

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

5 1. Procedimiento para la obtención de inhibidores para glicosidohidrolasas, que actúan en el tracto digestivo, caracterizado porque organismos de la familia Bacillaceae, especialmente de la clase Bacillus, se cultivan en caldos de cultivo usuales a temperaturas de unos 15 hasta unos 80°C durante aproximadamente 1 hasta 8 días, bajo aireamiento, en recipientes de fermentación usuales, las células se separan por centrifugación y los inhibidores se aíslan del caldo de cultivo ó de los extractos de las células 10 mediante operaciones de purificación usuales.

2. Procedimiento para la obtención de inhibidores para glicosidohidrolasas, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

15 Esta Memoria consta de 45 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 18 AGO. 1972

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

J. M. GOMEZ ACEBO Y POMBO
p. p. Firmado: J. Suarez Diaz

