

20 JUL. 1978

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Concedido el Registro de acuerdo  
Registro de la Propiedad Industrial con los datos que figuran en la presente descripción y según el tenor de la Memoria adjunta.



ESPAÑA

PATENTE DE INVENCION

(11) NUMERO 465.940
(22) FECHA DE PRESENTACION 13-1-78

(10) A1

(30) PRIORIDADES:		
(31) NUMERO P 27 01 890.2	(32) FECHA 19-1-77	(33) PAIS Rep. Federal Alemana
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D, C12M; A61K	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
(54) TITULO DE LA INVENCION "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN INHIBIDOR PEPTIDICO DE HIDROLASA DE GLICOSIDOS"		
(71) SOLICITANTE (S) HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT (HOE 77/F 004)		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE D- 6230 Frankfurt/Main 80, Republica Federal Alemana		
(72) INVENTOR (ES) Dr. Volker Oeding, Dr. Werner Pfaff, Dr. Laszlo Vértesy y Dr. Hans-Ludwig Weidenmüller.		
(73) TITULAR (ES) HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT		
(74) REPRESENTANTE DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ. (P.- 67.800)		

ABV./

1 La presente invención se refiere a un nuevo inhibidor de las hidrolasas de glicósidos del tracto digestivo, especialmente de las  $\alpha$ -amilasas de páncreas. La invención se refiere, además, a la producción de tal inhibidor por fermentación del microorganismo específico, *Streptomyces tendae*, cepa 4158, así como de sus variedades y mutantes, de la mencionada cepa microbiana como tal y también a un procedimiento para la obtención del inhibidor a partir de la carga de fermentación, y a su purificación.

5  
10 Son conocidos inhibidores de hidrolasas de glicósidos procedentes de microorganismos, especialmente de actinomicetos. Las sustancias hasta ahora investigadas con más detalle pertenecen típicamente a la clase de los oligosacáridos o polisacáridos. Inhibidores correspondientes, con posible carácter peptídico, se describen como térmicamente inestables, más o menos fácilmente inactivables por tripsina y, sobre todo, comparativamente menos activos.

15  
20 Se ha encontrado ahora en cargas de fermentación de *Streptomyces tendae*, cepa 4158, una sustancia inhibidora, de gran actividad, de la  $\alpha$ -amilasa de páncreas, que puede clasificarse químicamente entre los péptidos.

25 El inhibidor se caracteriza por un peso molecular de 5.000 a 10.000, un máximo de absorción de luz ultravioleta a 276 nm, un punto isoeléctrico de 4,4, y una composición en aminoácidos como la que se indica más adelante.

1 El inhibidor de acuerdo con la invención tiene  
un peso molecular relativamente alto. No se difunde o,  
en todo caso, se difunde sólo en una proporción muy peque  
ña, a través de membranas dializadoras usuales en el co  
mercio, tales como cámaras de Visking<sup>(R)</sup>. Naturalmente,  
5 la determinación del peso molecular exacto es difícil y  
se llega a resultados diferentes con diversos métodos de  
determinación. Si para la determinación del peso molecu  
lar se emplea la ultracentrífuga analítica (Biochemisches  
Taschenbuch, 2ª parte, páginas 746 a 767), se obtienen va  
10 lores de 10.000 aproximadamente. Por el contrario, si se  
utilizan tamices moleculares, tales como Sephadex<sup>(R)</sup> G-50  
superfino, se determina un peso molecular de 5.000 o in  
cluso aún más bajo. Según esto, basándose en los resul  
tados de investigaciones actualmente disponibles, hay que  
15 adoptar un peso molecular comprendido entre 5.000 y  
10.000.

El compuesto de acuerdo con la invención es una  
sustancia incolora. Sin embargo, absorbe luz ultraviole  
ta, con un máximo que se encuentra en 276 nm, que presen  
ta un hombro en 281 nm.  $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 16$ . La figura 1 repro  
duce un espectro de absorción.

Según su estructura química, el inhibidor es un  
péptido. Por hidrólisis puede ser desdoblado en aminoáci  
dos. Hasta ahora no se ha conseguido detectar, además

25

23018

1 de los aminoácidos, ningún otro componente. Si se deter-  
 mina la composición de aminoácidos con el método detalla-  
 do por St. Moore y W. H. Stein (Methods in Enzymology, vo-  
 lumen VI, página 819 a 831, editado por Colovick y Kaplan  
 en Academic Press, Nueva York, Londres, 1963), se puede  
 5 determinar la siguiente composición.

	Acido aspártico	5-6
	Treonina	5-6
	Serina	3-5
	Acido glutámico	5-6
10	Prolina	2-3
	Alanina	5-6
	Glicina	5-6
	Cisteína	3-4
	Valina	5-6
15	Isoleucina	1-2
	Leucina	3-4
	Tirosina	4-5
	Fenilalanina	0-2
	Histidina	1-2
20	Lisina	0-1
	Arginina	2-3
	Triptófano	1-2

El valor del triptófano se estimó a partir de la

1 - absorción de luz ultravioleta. Es natural, que los resul-  
tados del estudio de los aminoácidos no siempre indican  
una sola proporción cuantitativa expresada con números en-  
teros, y que tales determinaciones están unidas general-  
mente con determinados errores. Según esto, los límites  
5 de variación reproducidos en la enumeración, no son debi-  
dos a una falta de homogeneidad del inhibidor, sino a la  
inevitable inexactitud de medición del método de análisis.  
Sin embargo, es característico del inhibidor de acuerdo  
con la invención, el que los aminoácidos: ácido aspárti-  
10 co, ácido glutámico, treonina, glicina, alanina y valina,  
representen una elevada proporción molecular, superior al  
promedio, del péptido y que la metionina parece faltar por  
completo en la sustancia pura. Puesto que la metionina es  
un aminoácido ampliamente difundido, su amplia ausencia  
15 constituye una buena señal característica para el inhibi-  
dor de acuerdo con la invención y puede servir para la de-  
terminación de la pureza del producto, especialmente tam-  
bién en procedimientos de enriquecimiento.

20 El inhibidor de acuerdo con la invención reac-  
ciona positivamente frente a reactivos peptídicos, pero  
negativamente frente a fenol-ácido sulfúrico.

El inhibidor de  $\alpha$ -amilasa de acuerdo con la  
invención, no contiene ninguna proporción de azúcares.  
Por ello, así como por su composición de aminoácidos, su

25

23018

1 peso molecular y su punto isoeléctrico, se diferencia de  
2 todos los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa conocidos. Los pre  
3 parados puros del inhibidor tienen una actividad de 2 a  
4  $3 \times 10^6$  UIA/g.

5 Para una sustancia de naturaleza peptídica, el  
6 inhibidor de amilasa reivindicado tiene una notable esta  
7 bilidad térmica. Incluso la cocción en un medio neutro  
8 o débilmente ácido (pH aproximadamente 4 a 8) durante 1  
9 minuto, carece de influencia digna de mención sobre sus  
10 propiedades inhibitorias de la hidrolasa de glucósidos.

11 El inhibidor es inactivado proteolíticamente  
12 sólo con mucha lentitud por pepsina, tripsina o la qui-  
13 miotripsina, en comparación con otras proteínas. Duran-  
14 te el espacio de tiempo de acción terapéutica no hay que  
15 contar, por ello, con una disminución de actividad, dig-  
16 na de mención, en el tracto digestivo.

17 El inhibidor tiene una alta especificidad de  
18 efecto. La  $\alpha$ -amilasa de páncreas es inhibida con ex-  
19 traordinaria intensidad, mientras que, por el contrario,  
20  $\alpha$ -amilasas bacterianas, por ejemplo las de *Bacillus*  
21 *subtilis*, no son inhibidas de manera commensurable. Del  
22 mismo modo, no se ha observado ninguna acción contra  $\beta$ -  
23 -amilasas.

24 Ya pequeñas dosis del inhibidor de amilasa de  
25 acuerdo con la invención, conducen a una inhibición com-



1		tro medio de 1 micra. Superficie entre lisa y ligeramente verrugosa.
	Formación de melanina en medio peptónico	Positiva
5	Reducción del nitrato:	Positiva
	Espectro de valoración del substrato	Glucosa ++ Arabinosa + Sacarosa + Xilosa + Inosita ++ Manita ++ Fructosa + Ramnosa ++ Rafinosa +- Celulosa -
10		
15		

La cepa *Streptomyces tendae* 4158 está depositada con el número de registro 31210 en la American Type Culture Collection (ATCC).

20 La fermentación puede realizarse a 25-35°C, preferiblemente a 28-30°C, bien sea sumergida en medio de cultivo con agitación o sacudidas, o en recipientes de fermentación de diversos tamaños, con agitación y aireación.

25 Como medio de cultivo se ha acreditado especial

1 mente una combinación de fuentes de carbono y de nitrógeno. Tal medio de cultivo contiene, por ejemplo, además  
de las sales inorgánicas usualmente utilizadas por microorganismos en el medio de cultivo, por lo menos una fuente  
5 de carbono, tal como almidón, glucosa, azúcar de caña, fructosa, lactosa, glicerina o melaza, así como por lo menos una fuente de nitrógeno, como harina de soja, líquido  
de maceración de maíz, extracto de levadura, harina de semillas de algodón, harina de cacahuete, peptona, polvo de  
leche, nitratos o sales amónicas.

10 Se ha mostrado como composición óptima (% en peso en solución) 3-5 % de almidón soluble, 0,2 - 0,6 % de maíz macerado, 0,5 - 1,5 % de glucosa, 0,5 - 1% de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,3 - 0,6 % de harina de soja, 0,5 - 1,5 % de peptona de caseína. También en otros medios nutricios  
15 con contenido de almidón, por ejemplo, uno a base de 2-6 % de harina de cacahuete, 1-3 % de fécula de patata, 3-5% de harina de avena, 3 - 5% de polvo lácteo, 1 - 2% de jarabe lácteo, 1 - 2% de lactosa, se obtiene el inhibidor de amilasa con buenos rendimientos, no siendo tan  
20 decisiva la elección de la fuente de nitrógeno y de la porción de tampón, en tanto se esté en márgenes fisiológicos. Sin embargo, si se reduce o se anula por completo el contenido de almidón, se reduce drásticamente el rendimiento de inhibidores. Por otro lado, si se aumentan

1 ta la concentración de almidón esencialmente por encima de 7%, el aprovisionamiento de oxígeno de los microorganismos se hace inferior al óptimo, debido a la elevada viscosidad. Como resultado de ello, disminuye el rendimiento de inhibidor.

5 En la carga de fermentación, la formación del inhibidor empieza, por lo regular, entre las 10 y 30 horas de la fermentación. En el espacio de las siguientes 20 horas, está ampliamente terminada. Tiempos de fermentación más prolongados no tienen ninguna influencia perjudicial sobre el rendimiento de inhibidor, pero éste tampoco continúa aumentando de un modo digno de mención. De ello se deduce que las cargas de fermentación han de mantenerse en actividad durante unas 30 a 70 horas.

10

15 Para el aislamiento del inhibidor, la masa celular se separa de la solución de fermentación, por medio de centrifugación, filtración o filtración con succión; puesto que la mayor parte de la sustancia activa se encuentra, por lo general, en el líquido de cultivo transparente.

20 En el caso de que, debido a condiciones especiales de fermentación, una parte del inhibidor permanezca en el material celular, no plantea ninguna clase de dificultades el extraer de él la sustancia activa mediante métodos adecuados, por ejemplo por extracción mediante

1 - agitación con un disolvente orgánico miscible con agua tal  
como metanol, para lo que resulta ventajosa una maceración  
adicional del material celular. La sustancia activa di-  
suelta en el medio de extracción puede ser liberada de los  
componentes celulares no disueltos, mediante centrifugación  
5 o filtración, y puede ser transformada subsiguientemente  
lo mismo que el líquido de cultivo transparente.

El inhibidor puede aislarse del líquido de cul-  
tivo, por métodos en sí conocidos de la química de las pro-  
teínas y de los péptidos. Así, son apropiadas precipita-  
10 ciones con disolventes orgánicos miscibles con agua, tales  
como acetona, isopropanol u otros alcoholes inferiores o,  
también, con sales, tales como sulfato amónico.

Es posible, además, adsorber el inhibidor sobre  
soportes adecuados, por ejemplo sobre carbón activo, y se  
15 parar éstos, por filtración o centrifugación, desde la so-  
lución acuosa. Esto puede tener lugar en un amplio margen  
de pH, entre 2 y 10, pero preferentemente se utiliza el  
margen comprendido entre pH 4 y 6. Igualmente pueden em-  
20 plearse cambiadores de iones para la separación del inhi-  
bidor de  $\alpha$ -amilasa de acuerdo con la invención. Puesto  
que la sustancia reivindicada posee propiedades tanto áci-  
das como también básicas, es decir que es anfótera, pue-  
de reaccionar tanto con cambiadores de cationes como tam-  
25 bién con cambiadores de aniones y, con ayuda de éstos, pue

1 de ser separada de la solución de fermentación. En este caso, pueden emplearse las técnicas que se describen en principio en el capítulo sobre cambiadores de iones en la obra Biochemischen Taschenbuch, de H. M. Rauen editada por Springer Verlag 1964, parte 2ª, páginas 808 a 824.

5 En el tratamiento de cargas de fermentación, que contienen en el líquido de cultivo la sustancia de acuerdo con la invención, es conveniente, con frecuencia, concentrar a éste. Para ello, puede recurrirse a los conocidos métodos de destilación, ultrafiltración, secado por atomi-  
10 zación y secado por congelación o liofilización, o a otros métodos conocidos. Del concentrado así obtenido, puede se- pararse nuevamente el inhibidor, con los métodos arriba descritos. Desde concentrados como los que constituyen los filtrados de medio de cultivo concentrados, el inhibi-  
15 dor puede enriquecerse también, eliminando las impurezas esenciales. Así, para la separación de sustancias de ti- po graso, se han acreditado extracciones con disolventes orgánicos. Mediante diálisis o, eventualmente, mediante ultrafiltración (C.J.O.R. y P. Morris "Separation methods  
20 in Biochemistry", Ditman Publishing, Londres 1976, pági- nas 944-950), la solución puede liberarse de sustancias de bajo peso molecular. Sustancias de alto peso molecu- lar, tales como ácidos nucleicos, polisacáridos o algunas sustancias proteínicas, pueden separarse mediante precipi-

1 - tación fraccionada por salificación, o mediante adición  
de un disolvente miscible con agua, tal como acetona, o de  
un alcohol inferior. La adición del agente de precipita-  
ción se dosifica en estos casos de tal modo que precipiten  
las sustancias fácilmente precipitables con pesos molecula  
5 res superiores a 100.000, mientras que el inhibidor de  
 $\alpha$ -amilasa permanece en solución. Las etapas de enrique-  
cimiento descritas pueden combinarse y variarse en cual-  
quier orden de sucesión. De esta manera, se consiguen so-  
luciones que están grandemente enriquecidas con inhibidor.

10 La purificación final puede efectuarse con diver-  
sos procedimientos oportunos, tales como cromatografía a  
través de gel y cromatografía en intercambiador de iones,  
o con procedimientos afines, cuyo principio de separación  
no se basa exclusivamente en intercambio de iones, tales  
15 como, por ejemplo, la separación en presencia de hidroxil-  
apatita. Además de ello, pueden emplearse precipitaciones  
con disolventes o con sales, electroforésis preparativa u  
otros métodos en sí conocidos. Se han acreditado especial-  
mente separaciones en presencia de cambiadores de iones  
20 portadores de grupos dietilaminoetilo (DEAE), así como pre-  
cipitaciones fraccionadas con sulfato amónico o con etanol,  
pudiendo obtenerse incluso material cristalino.

Las propiedades del inhibidor de acuerdo con la  
invención, son interesantes desde el punto de vista de su

1 - empleo como agente terapéutico contra la diabetes y la  
prediabetes, así como contra la obesidad y como refuerzo  
de la dieta.

5 Productos alimenticios feculentos conducen en  
animales y en hombres a un aumento del azúcar en la san-  
gre y, por ello, también, a una secreción acrecentada de  
insulina del páncreas. La hiperglicemia tiene lugar me-  
diante el desdoblamiento del almidón para formar glucosa,  
en el tracto digestivo, bajo acción de amilasa y maltasa.

10 En el caso de diabéticos, esta hiperglicemia es  
especialmente pronunciada y duradera.

En el caso de obesos, la secreción acrecentada  
de insulina influye sobre la lipogénesis y reduce la lipó-  
lisis.

15 La hiperglicemia alimentaria, así como la hiper-  
insulinemia después de ingestión de féculas y almidones,  
puede reducirse mediante el inhibidor de amilasa reivindi-  
cado. Este efecto depende de la dosis. El inhibidor de  
amilasa de acuerdo con la invención, puede ser empleado,  
por ello, como agente terapéutico, en el caso de diabetes,  
20 prediabetes y obesidad, así como para el refuerzo de la  
dieta. A este fin, se recomienda una administración, espe-  
cialmente en las comidas. La dosificación, que debe regir-  
se por el peso del paciente así como por las necesidades  
individuales, asciende aproximadamente a valores entre  
25

1 10.000 y 300.000 UIA, pero puede ser también superior o inferior en casos aislados justificados.

El inhibidor de amilasa de acuerdo con la inven  
ción es adecuado especialmente para su administración por  
vía oral. Puede ser empleado como sustancia pura, pero tam  
5 bién en forma de un preparado farmacéutico, utilizando los  
excipientes y sustancias auxiliares usuales.

También puede ser ventajoso un empleo combinado  
con otros medicamentos, tales como sustancias que disminu  
yen el azúcar en la sangre o que disminuyen los lípidos,  
10 Puesto que los péptidos de alto peso molecular, como ta-  
les, no son resorbidos o no lo son de un modo digno de men  
ción, desde el tracto digestivo, no es de esperar de la  
sustancia de acuerdo con la invención ningún efecto secun  
dario toxicológicamente grave. Debido a la composición de  
15 aminoácidos no extraordinaria, hay que considerar también  
fisiológicamente inocuos a los eventuales productos de des  
doblamiento proteolítico. Correspondientemente, en el caso  
de administración por vía oral, incluso en dosis elevadas,  
del inhibidor de amilasa a los animales de ensayo, no pu-  
20 do apreciarse ningún síntoma llamativo. Asimismo, en el ca  
so de administración intravenosa a ratones (1 g/kg), el in  
hibidor de acuerdo con la invención fue tolerado sin nin-  
gún efecto tóxico apreciable en un tiempo de observación  
de 24 horas.

1                    Para el ensayo del efecto farmacológico del inhi-  
bidor de amilasa, ratas Wistar, machos, en ayunas, con un  
peso corporal entre 200 y 250 gramos, recibieron por admi-  
nistración oral, la sustancia inhibidora de la invención,  
5                    simultáneamente con 2 g de almidón por kilogramo de peso  
corporal, después de que inmediatamente antes se había  
efectuado una toma de sangre para la determinación del va-  
lor de partida de azúcar en sangre. Se efectuaron otras  
tomas de sangre al cabo de 15 y 30 minutos, así como al ca-  
bo de 1, 2, 3 y 5 horas, desde la vena caudal. Las deter-  
minaciones de azúcar en la sangre se realizaron según el  
10                   método de Hoffman en un autoanalizador (J. Biol. Chem.  
120, 51 (1937)).

                  Los ratones NZO presentan una tolerancia pertur-  
bada a la glucosa. Son por ello especialmente adecuados pa-  
15                   ra investigaciones en las que se influye sobre el nivel de  
glucosa en la sangre. La disposición de ensayo correspon-  
de a la adoptada en el caso de las ratas. La toma de san-  
gre se efectúa desde el plexo venoso orbital. La variación  
de los valores de azúcar en la sangre se observó durante  
20                   3 horas.

                  La comprobación de la sustancia activa se efec-  
tuó de manera análoga con ratones NMRI. Las tomas de san-  
gre se efectúan igualmente desde el plexo venoso orbital y  
la variación de los valores de azúcar en la sangre se obser-  
25                   va.

1 va durante 3 horas.

En estas disposiciones de ensayo, los animales tratados con el inhibidor de acuerdo con la invención, mostraban, en comparación con animales no tratados, un aumento del azúcar en sangre retardado y menor.

5

#### Ensayo de amilasa

Una unidad inhibidora de amilasa (UIA) se define como la cantidad de inhibidor que en las condiciones de ensayo, es capaz de inhibir hasta 50%, dos unidades de amilasa (UA). Una unidad de amilasa es, por acuerdo internacional, la cantidad de enzima que en un minuto desdobra 1 microequivalente de enlaces glucosídicos en el almidón. Los microequivalentes de enlaces glucosídicos desdoblados se determinan fotométricamente, como microequivalentes de azúcar reductor, con ácido dinitrosalicílico. Los datos se dan como micromoles de maltosa, los cuales se calculan con ayuda de una recta de contraste de maltosa.

15

Los ensayos se realizaron de la siguiente manera:

20

Se incuban de manera previa conjuntamente  $\alpha$ -amilasa de páncreas de cerdo y la solución a ensayar, en 1,0 ml de tampón de fosfato 20 mM, pH 6,9 + 10 mM NaCl, durante 10 a 20 minutos, a 37°C. La reacción enzimática se inicia mediante adición de 1,0 ml de almidón soluble, según Zulkowski (0,25 % en el tampón indicado). Al cabo de 10

25

1 minutos exactamente, se interrumpe la reacción con 2,0 ml  
de reactivo coloreador de ácido dinitrosalicílico (según  
Boehringer Mannheim : Biochemica-Information II) y se ca  
5 lienta durante 5 minutos en baño de agua en ebullición  
(baño María) para revelar el color. Después de enfriar,  
se mide la extinción a 546 nm, en comparación con el valor  
testigo de los reactivos. La inhibición de 50%, en compa  
ración con la reacción enzimática no inhibida, mediante em  
pleo de diversas cantidades de inhibidor, se determina grá  
10 ficamente mediante representación probabilística.

#### Ejemplo 1

La cepa *Streptomyces tendae* 4158 se inocula en  
tubitos inclinados, con un substrato nutritivo de la si  
guiente composición:

15 50 g de copos de avena

adición 1.000 ml H<sub>2</sub>O      pH<sub>A</sub> 7,2

El tubito inoculado se incuba a 30°C durante 7  
días y después, se mantiene a +4°C. Las esporas se reti  
ran del tubito inclinado, arrastrándolas con 10 ml de agua  
20 destilada esterilizada o de solución fisiológica de cloru  
ro sódico. 1,0 ml de la suspensión sirve para inocular un  
matraz Erlenmeyer de 300 ml, el cual está provisto de 35  
ml de solución nutritiva esterilizada, con un valor de pH  
de 7,7 y la siguiente composición:

- 1
- 1 % de glucosa
  - 1 % de harina de soja
  - 0,25% de NaCl

pH 7,7

El matraz se somete a una agitación por sacudidas, a 220 revoluciones por minuto, durante 48 horas, a +30°C, sobre una máquina de agitación por sacudidas, con una amplitud de 4 cm. Después de ello, porciones de 5 ml de este cultivo previo se trasladan a varios matraces Erlenmeyer, los cuales están provistos con 35 ml de solución nutritiva esterilizada, que tiene un valor de pH de 8,3. La composición de este cultivo principal es la siguiente:

- 15
- 4 % de almidón
  - 0,4 % de líquido de maceración de maíz
  - 1,0 % de glucosa
  - 0,8 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
  - 0,4 % de harina de soja
  - 1,0 % de peptona

pH 8,3.

Los cultivos principales se someten igualmente a una agitación por sacudidas, a +30°C, con 220 revoluciones por minuto, en una máquina de agitación por sacudidas, con una amplitud de 4 cm, durante 2 a 3 días. Al cabo del primero, del segundo y del tercer días de cultivo, se determina el contenido de inhibidor de  $\alpha$ -amilasa, según la descripción de ensayo.

1 La cepa *Streptomyces tendae* 4158 proporciona, en las condiciones de cultivo y de ensayo descritas, en promedio 100 UIA/ml, con un pH final de 5,2.

Ejemplo 2.

5 La carga es como en el Ejemplo 1, pero como cultivo principal se elige un recipiente de fermentación de 300 litros de volumen total, que está provisto con 200 litros de una solución nutritiva esterilizada de la siguiente composición:

10 4 % de almidón  
0,4 % de líquido de maceración de maíz  
1,0 % de glucosa  
0,8 % de  $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$   
15 1,0 % de peptona de caseína  
0,1 % de Desmophen pH 8,3-8,5

20 El tiempo de esterilización para la carga asciende a 45 minutos, a 121°C y 1 bar, esterilizándose la glucosa por separado y, después de enfriar el fermentador a la temperatura de funcionamiento, añadiéndola en condiciones estériles.

25 El pH debe ser de 6,8 después de la esterilización y, según sea necesario, se ajusta a este valor con ácido esterilizado ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  2 n) o lejía (NaOH 2 n). La etapa principal se inoculara con 20 litros, correspondientes a

1 - 10% de un cultivo previo como se ha descrito en el Ejemplo 1 y preparado en un fermentador pequeño de 30 litros de volumen total.

5 Se fermenta durante 50 a 70 horas, a 30°C. La aireación es de 6 m<sup>3</sup>/hora, con una agitación a 250 revoluciones por minuto y una sobrepresión de 0,3 bares.

10 Mediante la toma de muestras se vigila y observa el curso de la fermentación, desde el punto de vista de la actividad de inhibidor, de la degradación de substrato, del desarrollo de biomasa y del comportamiento físico-técnico de la solución de cultivo (tensión superficial, viscosidad, densidad, presión osmótica).

15 La actividad inhibidora máxima se alcanza al cabo de las 60 horas de cultivo con un promedio de 105 UIA/ml. Después de ello, el contenido del fermentador se lleva al tratamiento.

### Ejemplo 3.

20 La carga como en el Ejemplo 1 y en el Ejemplo 2, pero como etapa principal se emplea un biorreactor de 4.000 litros de volumen total, que está provisto con 2.500 litros de la siguiente solución nutritiva:

6 % de almidón

1,0 % de glucosa

0,4 % de líquido de maceración de maíz

1 0,8 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$   
1,0 % de peptona de soja  
0,1 % de Desmophen  $\text{pH}_A$  7,0-7,3.

5 El tiempo de esterilización para esta carga asciende a 60 minutos, a  $121^\circ\text{C}$  y 1 bar, filtrándose la glucosa por separado en condiciones estériles y, después de enfriamiento del fermentador a la temperatura de funcionamiento, bombeándola a éste en condiciones estériles.

10 El valor de pH se ajusta -cuando sea necesario- con ácido estéril ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) o con lejía (NaOH) hasta un valor inicial de 7,0 - 7,3.

Se incula con 200 litros de un cultivo previo descrito y preparado en el Ejemplo 2.

15 El tiempo de fermentación asciende a 70 horas, fermentándose a una temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , con una aireación de 60 metros cúbicos en condiciones normales/hora, una sobrepresión de 0,5 bares, y a 180 revoluciones por minuto.

20 Mediante toma de muestras - como se ha descrito en el Ejemplo 2- se vigilan todos los datos importantes de proceso, de organismos y de actividad, a lo largo de la totalidad del tiempo de fermentación.

25 Al cabo de 70 horas de fermentación se alcanza una concentración de actividad media de 95 UIA/ml. La fermentación se interrumpe seguidamente, y la solución de cultivo se lleva al tratamiento.

1

Ejemplo 4.

10 litros de un líquido de cultivo filtrado, con una actividad de 100 UIA/ml, se seca en un secador por atomización y se obtienen como resultado 400 g de un polvo de color pardo claro. Después, se somete éste a desengrasado con una mezcla de 1 litro de metanol y 1 litro de cloroformo, se agita a fondo y, seguidamente, se filtra con succión. El producto no disuelto, todavía humedecido con disolvente, en el que está contenida la sustancia activa, se disuelve en 3 litros de agua, se ajusta a pH 6,5 y se mezcla con 4,5 litros de metanol. De este modo, se forma un precipitado floculento, claro, el cual se elimina por centrifugación y se desecha, puesto que solamente contiene cantidades despreciables de la sustancia inhibidora de  $\alpha$ -amilasa. La porción sobrenadante, oscura, de la precipitación con metanol, que contiene el inhibidor deseado, se libera seguidamente del metanol en vacío, y la solución concentrada ahora hasta 2,5 litros, se dializa frente a agua destilada, hasta quedar exenta de sales. La porción retenida contiene 9 g de sustancia seca (actividad específica 96 UIA/mg). La porción retenida se lleva seguidamente a una saturación de 50%, a pH 5,5, con sulfato amónico, para lo que son necesarios 79 g de la sal por 250 ml. En la precipitación salina se forma un precipitado que contiene aproximadamente 90% de sustancia

25

1 activa. Después de centrifugar, se desecha la porción sobrenadante. El precipitado se disuelve nuevamente en agua destilada y se mezcla nuevamente, a pH 8, con sulfato amónico, pero esta vez se satura primeramente sólo hasta 15% y, después de separar el precipitado, se sigue saturando hasta 35%. El precipitado obtenido de la precipitación salina entre 15 y 35%, contenía la cantidad principal del inhibidor de amilasa. Se repite esta precipitación fraccionada. El producto formado asciende a 360 mg, después de diálisis y secado, con una actividad específica de 992 UIA/mg. 350 mg de esta sustancia bruta se someten seguidamente a separación y enriquecimiento, en una columna de vidrio de 100 cm de longitud y 1,2 litros de capacidad, llena con Sephadex<sup>(R)</sup> G-50 de grano fino. Como agente de hinchamiento y de elución sirve una solución acuosa de tampón de fosfato 5 milimolar de pH 8, a la que se ha añadido 0,02 % de azida sódica. La sustancia bruta se disuelve en 15 ml del mismo tampón y se carga sobre la columna. La elución se efectúa durante 2 días, retirándose fracciones de 15 ml de contenido. Las cuatro fracciones más activas se reúnen, se dializan hasta quedar libres de sales, y se secan por congelación. Proporcionan 60 mg de un polvo blanco con una actividad de 2.520 UIA de inhibidor de  $\alpha$ -amilasa/mg.

1      Ejemplo 5.

2.200 litros de líquido de cultivo se enfrían a 6°C y, después de añadir 2% de tierra de infusorios, se filtran a través de un filtro-prensa de cámaras. La torta de filtración (alrededor de 450 kilogramos, húmeda) se  
5      desecha, el filtrado transparente (1750 litros, con una actividad de 95 UIA/ml) se concentra, después de añadirle 500 g de azida sódica, en un evaporador de corriente descendente, hasta 120 litros. El concentrado obtenido se enfría a 1°C y se mezcla lentamente con agitación, con  
10      120 ml de acetona previamente enfriada. Para una precipitación completa, se continúa agitando seguidamente durante 1/4 horas y, después de la adición de 1 kg de tierra de infusorios, se clarifica en una prensa de tornillo sin fin. La materia sólida con el agente auxiliar de fil-  
15      tración se desecha. El filtrado acetónico, que contiene la sustancia activa, se mezcla con 380 litros de acetona, agitando y enfriando, con lo que se forma una suspensión en acetona aproximadamente al 80%. El precipitado (2) formado contiene el inhibidor de amilasa deseado.

20      Este se obtiene, dejando en reposo el líquido de precipitación, sin agitar. De este modo, el precipitado se deposita y la porción sobrenadante puede ser recogida por sifonamiento. De la porción sobrenadante de esta  
25      segunda precipitación con acetona, pueden separarse por

1 centrifugación pequeñas cantidades de precipitado. Esta  
materia sólida se disuelve a pH 7 y se añade a la solución  
del precipitado (véase más abajo). El precipitado princi-  
pal que permanece en el recipiente de precipitación, se di-  
suelve en 120 litros de agua a pH 7, y la solución resul-  
5 tante se clarifica con una centrífuga de paso o continua  
(Cepa <sup>(R)</sup>, 1700 revoluciones por minuto). De este modo se  
separan 90 g de partículas en suspensión inactivas. La fa-  
se acuosa transparente se concentra ahora hasta 15 litros  
y se dializa con una instalación de ultrafiltración DDS  
10 (Membrana nº 800). Para completar la desalinización, la  
porción retenida se diluye con agua destilada y se concen-  
tra de nuevo. Después de repetir esta operación de 2 a 3  
veces, la porción retenida, en la que está contenido el  
inhibidor de amilasa, está prácticamente libre de sales.  
15 A partir de 50 litros de solución de la porción retenida  
se precipita seguidamente la sustancia inhibidora, a pH  
5,5, mediante adición de 19,5 kg de sulfato amónico, se  
somete a separación por centrifugación y se desecha la  
porción sobrenadante. El precipitado se disuelve nueva-  
20 mente en 40 litros de agua y, esta vez se precipita a pH  
7,5 con 12,5 kg de sulfato amónico. Después de separar  
la fase transparente en una centrífuga tubular, el preci-  
pitado se somete a precipitación fraccionada como en el  
Ejemplo 4 : Desde 40 litros de la sustancia nuevamente di-

1 suelta se precipita, a pH 5,5, mediante adición de 3,2 kg  
de sulfato amónico, primeramente un precipitado inactivo,  
el cual se separa y se desecha. Después, mediante concen-  
tración adicional de la fase líquida, se separa del líqui-  
do, con 7,4 kg de sulfato amónico, la parte principal de  
5 la actividad. Este precipitado se recoge, se dializa fren-  
te a agua destilada y se seca por congelación. Se obtie-  
nen como resultado 114 g de un polvo pardo con una activi-  
dad de 1.100 UIA/mg.

Para la separación ulterior, se carga una colum-  
10 na de vidrio de 5 cm de diámetro y 50 cm de altura (apro-  
ximadamente 1 litro de capacidad) con DEAE-Sephadex A-25<sup>(R)</sup>,  
que previamente ha sido equilibrada con tampón fosfórico  
1/30 molar, a pH 7,5 y con 0,02 % de azida sódica. Ahora,  
se disuelven 10 g de sustancia en 100 ml del mismo tampón  
15 y se cargan sobre la columna. Primeramente, se lava la  
columna con 1 litro del mismo tampón, después se añade  
gradualmente sal común a este agente de elución, de tal  
forma que se garantice un gradiente continuo. Si el flú-  
do saliente de la columna se recoge fraccionadamente, el  
20 inhibidor de amilasa se encuentra en las fracciones, en  
las que la concentración de cloruro sódico es aproximada-  
mente 0,5 molar.

Estas fracciones se reúnen y se dializan frente  
25 a agua destilada. El secado por congelación proporciona

1 5,6 g de sustancia de color pardo claro, con una actividad de 2.200 UIA/mg.

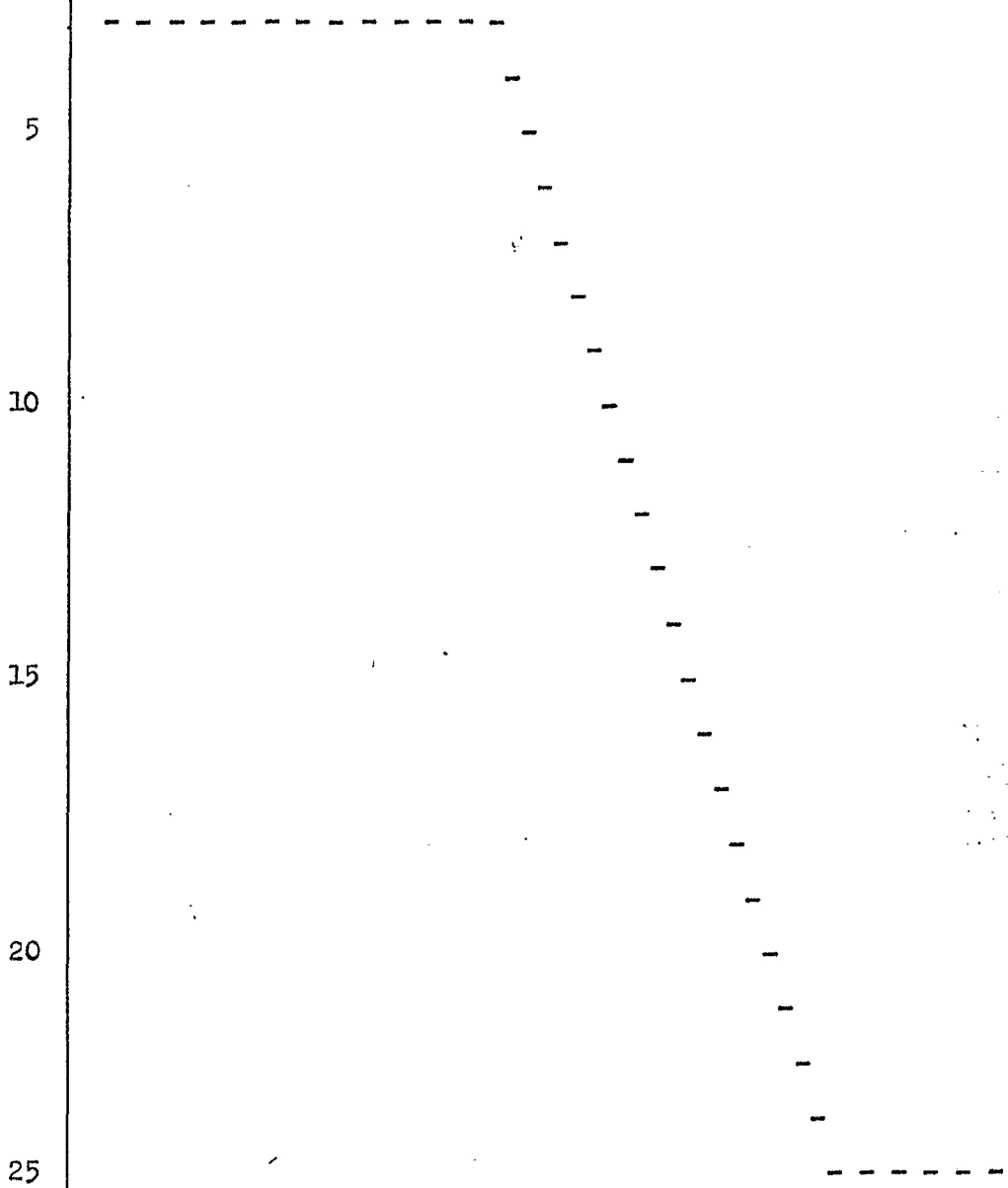
A esto le sucede adicionalmente una purificación cromatográfica a través de gel - como se ha descrito en el Ejemplo 4 -. De los 5,6 g de material se obtienen como resultado 4,1 g de un polvo incoloro, cuya actividad asciende a 2.800 UIA/mg. El análisis de aminoácidos del producto da como resultado, después de una hidrólisis durante 20 horas con ácido clorhídrico, con ayuda de un analizador multicromático de Beckman, la siguiente composición:

10	Acido aspártico	7,72 %
	Treonina	7,66 %
	Serina	5,35 %
	Acido glutámico	10,05 %
15	Prolina	3,43 %
	Glicina	4,93 %
	Alanina	5,84 %
	1/2 cisteína	4,26 %
	Valina	7,72 %
20	Metionina	0,41 %
	Isoleucina	2,30 %
	Leucina	5,18 %
	Tirosina	10,24 %
25	Fenilalanina	3,35 %

23018

P-

1	Histidina	3,01 %
	Lisina	1,45 %
	Arginina	5,16 %



23018

1

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Procedimiento para la preparación de un inhibidor peptídico de hidrolasa de glicósidos con un peso molecular de 5.000 a 10.000, con un máximo de absorción en luz ultravioleta a 276 nm, con un punto isoeléctrico de 4,4 y con la siguiente composición de aminoácidos:

15

Acido aspártico	5 - 6	Isoleucina	1 - 2
Treonina	5 - 6	Leucina	3 - 4
Serina	3 - 5	Tirosina	4 - 5
Acido glutámico	5 - 6	Fenilalanina	0 - 2
Prolina	2 - 3	Histidina	1 - 2
Glicina	5 - 6	Lisina	0 - 1
Alanina	5 - 6	Arginina	2 - 3
Cistefna	3 - 4	Triptófano	1 - 2
Valina	5 - 6,		

20

caracterizado porque se cultiva *Streptomyces tendea* 4158 (ATCC N.º 31210) y se obtiene el inhibidor a partir del cultivo.

25

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque se cultiva *Streptomyces tendea* 4158 en un medio de cultivo que contiene por lo menos una fuente de carbono, por lo menos una fuente de nitrógeno, y sa-

30

220378

1 les orgánicas.

3ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, caracterizado porque el medio nutritivo contiene 3 a 5 % de almidón soluble; 0,2 a 0,6 % de líquido de maceración de maíz; 0,5 a 1,5 % de glucosa; 0,5 a 1% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,3 a 0,6 % de harina de soja, y 0,5 a 1,5% de peptona de caseína.

4ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, caracterizado porque el medio nutritivo contiene 2 a 6% de harina de cacahuete; 1 a 3 % de fécula de patata; 3 a 5 % de harina de avena; 3 a 5 % de polvo lácteo; 1 a 2 % de jarabe lácteo, y 1 a 2 % de lactosa.

5ª.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN INHIBIDOR PEPTIDICO DE HIDROLASA DE GLICOSIDOS".

15 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

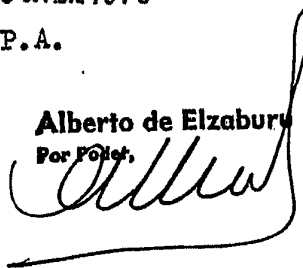
Esta Memoria consta de TREINTA hojas escritas a máquina por una sola cara.

20

Madrid, 06.ABR.1978

P.A.

Alberto de Elzaburu  
Por Fidei.



25

30

220378

VAL

