



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑤① Int. Cl.³: A 61 K 31/70

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein



⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑪

637 542

②① Numéro de la demande: 1140/79

②② Date de dépôt: 06.02.1979

③⑩ Priorité(s): 10.02.1978 JP 53-14407
10.02.1978 JP 53-14408

②④ Brevet délivré le: 15.08.1983

④⑤ Fascicule du brevet
publié le: 15.08.1983

⑦③ Titulaire(s):
Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo (JP)

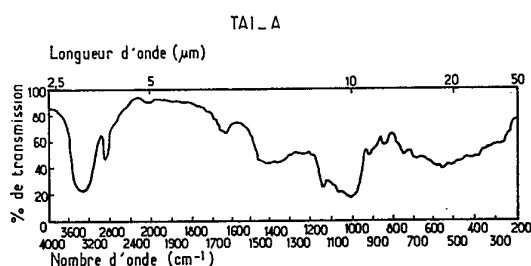
⑦② Inventeur(s):
Shinjiro Namiki, Omiya/Saitama (JP)
Kunio Kangouri, Kitamoto/Saitama (JP)
Takatoshi Nagate, Kashiwa/Chiba (JP)
Kazuhiko Sugita, Omiya/Saitama (JP)
Sadafumi Omura, Ageo/Saitama (JP)

⑦④ Mandataire:
William Blanc & Cie conseils en propriété
industrielle S.A., Genève

⑤④ Procédé de préparation d'inhibiteurs d'amylase, produits ainsi obtenus et compositions pharmaceutiques les contenant.

⑤⑦ Les produits sont obtenus en inoculant un ensemencement de la souche de *Streptomyces calvus* TM-521 dans un milieu nutritif aqueux, en le cultivant avec agitation ou par un procédé de culture immergée avec aération, et en séparant les inhibiteurs d'amylase produits, dits TAI-A et TAI-B, à partir du bouillon de culture.

Les substances dites TAI-A et TAI-B, possèdent une forte activité inhibitrice vis-à-vis de l'amylase et de l'invertase, et sont employées notamment pour combattre l'obésité, le diabète, le pré-diabète, la gastrite, l'ulcère d'estomac, l'hyperglycémie et l'hyperlipémie.



REVENDEICATIONS

1. Inhibiteur d'amylase dit TAI-A; constitué par une poudre amorphe blanche; ayant un point de décomposition de 137-142°C; contenant du carbone, de l'hydrogène et de l'azote avec les valeurs analytiques (%) de C: 41,44, H: 6,27, N: 1,32; ayant un pouvoir rotatoire optique $[\alpha]_D^{25} = +157,3^\circ$ (c=0,5%, eau); ayant une valeur de pKa de 4,2 (dans l'eau); ayant un poids moléculaire de 950-1050 (estimation par filtration sur gel sur le produit dit Sephadex G-15), étant soluble dans l'eau et dans le diméthylsulfoxyde, et insoluble dans le méthanol, la pyridine, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'acétone; ayant le spectre d'absorption dans l'infrarouge présenté sur la fig. 1; ayant le spectre de résonance magnétique nucléaire présenté sur la fig. 3; donnant des réactions positives avec le test de Molisch et à l'anthrone; son hydrolysat acide donnant une réaction positive avec la ninhydrine, et présentant les valeurs de Rf sur chromatographie sur couche mince [gel de silice dit 60F254 (Merck)] et par chromatographie sur papier N° 50 (Toyo Roshi Co. Ltd.) comme suit:

Chromatographie sur couche mince		Chromatographie sur papier	
Système de solvants	Valeur de Rf	Système de solvants	Valeur de Rf
n-Propanol à 65%	0,40	n-Propanol à 65%	0,16
n-Butanol: pyridine: eau (6:4:2,5)	0,21	Pyridine: n-propanol: acide acétique: eau (10:15:3:12)	0,42

2. Inhibiteur d'amylase dit TAI-B; constitué par une poudre amorphe blanche; ayant un point de décomposition à 169-174°C; contenant du carbone, de l'hydrogène et de l'azote avec les valeurs analytiques (%) de C: 42,20, H: 6,47, N: 2,08; ayant un pouvoir rotatoire optique $[\alpha]_D^{25} = +142^\circ$ (c=0,5%, eau); ayant une valeur de pKa de 4,5 (dans l'eau); ayant un poids moléculaire de 650-700 (estimation par filtration sur gel sur le produit dit Sephadex G-15); étant soluble dans l'eau et dans le diméthylsulfoxyde, légèrement soluble dans le méthanol et la pyridine, et insoluble dans l'éthanol, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'acétone; ayant le spectre d'absorption dans l'infrarouge présenté sur la fig. 2, et ayant le spectre de résonance magnétique nucléaire présenté sur la fig. 4; donnant des réactions positives avec le test de Molisch et à l'anthrone; son hydrolysat acide donnant une réaction positive avec la ninhydrine; et présentant les valeurs de Rf par chromatographie sur couche mince de gel de silice dit 60F254 Merck et par chromatographie sur papier N° 50 (Toyo Roshi Co., Ltd.) comme suit:

Chromatographie sur couche mince		Chromatographie sur papier	
Système de solvants	Valeur de Rf	Système de solvants	Valeur de Rf
n-Propanol à 65%	0,46	n-Propanol à 65%	0,28
n-Butanol: pyridine: eau (6:4:2,5)	0,32	Pyridine: n-propanol: acide acétique: eau (10:15:3:12)	0,53

3. Procédé de production d'un inhibiteur d'amylase dit TAI-A indiqué dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à ino-

culer un ensemencement de la souche de *Streptomyces calvus* TM-521 dans un milieu nutritif aqueux, à le cultiver avec agitation ou par un procédé de culture immergée avec aération, et à séparer l'inhibiteur d'amylase produit, dit TAI-A, à partir du bouillon de culture.

4. Procédé de production d'inhibiteur d'amylase dit TAI-B indiqué dans la revendication 2, caractérisé en ce qu'il consiste à inoculer un ensemencement de la souche de *Streptomyces calvus* TM-521 dans un milieu nutritif aqueux, à le cultiver avec agitation ou par un procédé de culture immergée avec aération, et à séparer l'inhibiteur d'amylase produit dit TAI-B, à partir du bouillon de culture.

5. Composition pharmaceutique notamment utilisée pour combattre l'obésité, le diabète, le prédiabète, la gastrite, l'ulcère d'estomac, l'hyperglycémie et l'hyperlipémie, caractérisée en ce qu'elle renferme, comme ingrédient actif, au moins un des inhibiteurs d'amylase dit TAI-A selon la revendication 1.

6. Composition pharmaceutique notamment utilisée pour combattre l'obésité, le diabète, le prédiabète, la gastrite, l'ulcère d'estomac, l'hyperglycémie et l'hyperlipémie, caractérisée en ce qu'elle renferme, comme ingrédient actif, au moins un des inhibiteurs d'amylase dit TAI-B selon la revendication 2.

La présente invention se rapporte à de nouveaux inhibiteurs d'amylase.

Comme inhibiteurs d'amylase connus, du genre oligosaccharide, on connaît déjà la Nojirimycine [«Agr. Biol. Chem.», 34, 966 (1970)], le S-AI (Amylostatine) (brevet américain N° 4010258), le NCGAI (demande de brevet japonais mise à la disposition du public N° 54990/76) et les dérivés d'aminosucres de Frommer et collaborateurs (brevet américain N° 4062950).

Les nouveaux inhibiteurs d'amylase du genre oligosaccharide, selon la présente invention, le TAI-A et le TAI-B, se distinguent de la Nojirimycine par suite de leur manque d'activité d'inhibition vis-à-vis de l' α -glucosidase, ils se distinguent du S-AI par suite de leur adsorption sur des résines acides et basiques échangeuses d'ions et par suite de leur manque d'activité inhibitrice vis-à-vis de l' α -amylase à liquéfaction bactérienne, ils se distinguent du NCGAI par suite de leur activité optique et de leur manque d'activité d'inhibition vis-à-vis de l' α -amylase à liquéfaction bactérienne, et ils se distinguent des dérivés d'aminosucres de Frommer et collaborateurs par suite de l'absence de groupe méthyle dans leurs molécules.

La présente invention se rapporte à de nouveaux inhibiteurs d'amylase et aux procédés pour leur production. Plus particulièrement, la présente invention se rapporte à de nouveaux inhibiteurs d'amylase, désignés par TAI-A et TAI-B, qui dérivent d'une nouvelle souche de micro-organismes appartenant au *Streptomyces calvus*. Elle se rapporte aussi au procédé pour la préparation de ces inhibiteurs.

Le but de la présente invention est de prévoir des produits microbiens possédant une activité d'inhibition vis-à-vis de l'amylase et de l'invertase. C'est encore un autre objet de la présente invention de prévoir des procédés pour préparer les inhibiteurs d'amylase, le TAI-A et le TAI-B.

Le TAI-A et le TAI-B de la présente invention peuvent être produits par culture d'une souche microbienne nouvellement isolée, appartenant au *Streptomyces calvus*, et chacun d'entre eux est obtenu sous forme de poudres amorphes selon les procédés de la présente invention. A la fois le TAI-A et le TAI-B représentent un certain genre d'inhibiteurs d'amylase du groupe des oligosaccharides et sont utiles pour combattre l'obésité, le diabète, le prédiabète, la gastrite, l'ulcère d'estomac, l'hyperglycémie, l'hyperlipémie et analogues.

La souche microbienne, qui produit le TAI-A et le TAI-B, a été isolée à partir d'un échantillon de sol et a été désignée par la titulaire sous le nom de *Streptomyces calvus* TM-521 (ATCC N° 31478).

La présente invention sera maintenant décrite en relation avec les dessins ci-joints dans lesquels:

la fig. 1 représente le spectre d'absorption dans l'infrarouge du TAI-A en utilisant une tablette de KBr;

la fig. 2 représente le spectre d'absorption dans l'infrarouge du TAI-B en utilisant une tablette de KBr;

la fig. 3 représente le spectre de résonance magnétique nucléaire du TAI-A dans D₂O;

la fig. 4 représente le spectre de résonance magnétique nucléaire du TAI-B dans D₂O;

la fig. 5 représente la stabilité du TAI-A, et

la fig. 6 représente la stabilité du TAI-B.

Les nouveaux inhibiteurs d'amylase, le TAI-A et le TAI-B, peuvent être préparés par la culture, dans des conditions contrôlées, d'une nouvelle souche de *Streptomyces calvus* TM-521 qui a été identifiée par le procédé généralement connu sous le nom d'ISP (International Streptomyces Project) décrit par Gottlieb et Shirling.

Les propriétés microbiologiques de la nouvelle souche, le *Streptomyces calvus* TM-521, sont les suivantes:

1. Données morphologiques générales

Le mycélium sur du saccharose/nitrate/agar-agar est formé en présentant des hyphes légèrement incurvés, bien que le développement du mycélium aérien soit faible.

Les mycéliums aériens sur la farine d'avoine/agar-agar, de l'extrait de levure/extrait de malt/agar-agar et du glucose/asparagine/agar-agar forment des spores abondantes.

L'examen microscopique de la culture qu'on a fait croître sur de la farine d'avoine/agar-agar présente des mycéliums aériens abondants et des chaînes de spores avec des spirales primitives. Une chaîne de spores mûre contient environ 10 spores en moyenne. Une photographie, prise au microscope électronique, de la spore présente une spore ovale à sphérique (0,7-1,0 × 1,0-1,4 µ) avec une surface velue.

2. Caractéristiques de culture

Certaines caractéristiques de culture de *Streptomyces calvus* TM-521 sont présentées dans le tableau I.

Tableau I
Caractéristiques de culture du *Streptomyces calvus* TM-521

Milieu	Croissance	Mycélium aérien	Pigment soluble
Saccharose/nitrate/agar-agar (27°C)	Mauvaise, blanche à blanche jaunâtre	Mauvais, partiellement blanc	Aucun
Glucose/nitrate/agar-agar (27°C)	Faible, petite colonie à coloration blanche jaunâtre	Aucun	Aucun
Glycérol/nitrate/agar-agar (27°C)	Blanche jaunâtre à marron jaunâtre, partiellement marron jaunâtre	Blanc à blanc laiteux	Aucun
Amidon/nitrate/agar-agar (27°C)	Blanche jaunâtre à jaune	Poudreux, blanc	Jaune pâle
Glucose/asparagine/agar-agar (27°C)	Bonne, blanche grisâtre à blanche jaunâtre, ultérieurement devenant marron jaunâtre	Blanc à blanc grisâtre, partiellement blanc ou gris	
Glycérol/asparagine/agar-agar (27°C)	Bonne, blanche grisâtre à blanche jaunâtre	Blanc	Aucun
Sel/amidon/agar-agar (27°C)	Bonne, blanche jaunâtre à marron jaunâtre	Blanc grisâtre à blanc laiteux, devenant ultérieurement brunâtre	Aucun
Agar-agar nutritif (27°C)	Mauvaise, blanche jaunâtre	Aucun	Aucun
Extrait de levure/extrait de malt/agar-agar (27°C)	Bonne, blanche jaunâtre à marron jaunâtre	Blanc à blanc grisâtre	Aucun
Farine d'avoine/agar-agar (27°C)	Bonne, blanche grisâtre à jaune grisâtre, ultérieurement devenant marron jaunâtre	Blanc à blanc grisâtre	Aucun
Tyrosine/agar-agar (27°C)	Bonne, blanche jaunâtre à marron jaunâtre, ultérieurement devenant marron	Blanc à blanc laiteux, devenant ultérieurement blanc grisâtre	Jaune laiteux pâle
Sang/agar-agar (37°C)	Mauvaise, coloration grise humide	Aucun	Aucun
Lait écrémé (37°C)	Faible, blanche	Aucun	Aucun

Tableau I (suite)
Caractéristiques de culture du *Streptomyces calvus* TM-521

Milieu	Croissance	Mycélium aérien	Pigment soluble
Bouillon de gélatine (27°C)	Faible, blanche jaunâtre	Aucun	Aucun

3. Propriétés physiologiques

Les propriétés physiologiques de la souche sont les suivantes:

Intervalle de températures de croissance: 20-45°C sur de la farine d'avoine/agar-agar.

Température de croissance optimale: 30°C.

Exigence en oxygène: aucune croissance ne se produit dans des conditions anaérobies.

Hydrolyse de l'amidon: positive.

Décomposition de la cellulose: négative.

Coagulation du lait écrémé: légèrement positive.

Peptonisation du lait écrémé: négative.

Liquéfaction de la gélatine: légèrement positive.

Liquéfaction du sérum coagulé de Loeffler: négative.

Hémolyse du sang: positive.

Réaction de la tyrosinase: négative.

Production de la mélamine: négative.

Production d'acide sulfhydrique: négative.

Réduction de nitrate: négative.

Le test d'utilisation de sources de carbone par le procédé de Pridham et Gottlieb montre que cette souche utilise de manière moyenne à complète le D-glucose, le D-xylose, le L-arabinose, l'amidon, le lactose, le D-fructose, le D-mannitol, le saccharose et le raffinose, mais n'utilise pas l'inositol, le L-rhamnose, le mannose, le galactose et la cellulose.

D'après les résultats indiqués ci-dessus, les caractéristiques microbiologiques de la souche TM-521 peuvent être résumées comme suit:

La souche TM-521 forme un mycélium aérien avec des spirales primitives, et la surface des spores est velue.

La croissance des divers milieux de synthèse est généralement blanche à blanche jaunâtre et le mycélium est généralement blanc à blanc grisâtre. On n'observe pas ordinairement de pigment soluble sauf lors de la culture sur de l'amidon/nitrate/agar-agar où un pigment jaune pâle se forme. Le mycélium végétatif sur des milieux organiques présente une bonne croissance à coloration blanche jaunâtre à marron jaunâtre, et le mycélium aérien coloré en blanc à blanc grisâtre est abondant.

Un pigment soluble n'est pas produit sur la plupart des milieux organiques, à l'exception du milieu de tyrosine/agar-agar.

Ces caractéristiques de la souche TM-521 sont relativement apparentées à celles de la série de couleur grise des *Streptomyces* classés par ISP. Parmi l'espèce connue de cette série, le *Streptomyces calvus* [«Antibiotics and Chemotherapy», 7, 532-540 (1957)] est très semblable à la souche TM-521 par rapport à de nombreuses caractéristiques, comprenant la forme de hyphes portant les spores et la surface des spores. Cette souche diffère cependant du *Streptomyces calvus* au point de vue de sa légère production de peptone à partir de lait écrémé, de sa forte utilisation d'inositol et de L-rhamnose et de sa légère utilisation de L-arabinose.

A partir de ces caractéristiques, on peut raisonnablement conclure que la souche appartient aux variétés de *Streptomyces calvus*, et on l'a finalement désignée sous le nom de *Streptomyces calvus* TM-521.

Cette souche a été déposée à l'Institut de Recherche des Fermentations, Agency of Industrial Science and Industry, Japan, étant enregistrée sous le nom de FERM-P N° 4283, le 1^{er} novembre 1977, et dans la collection de Cultures Types Américaines, Rockville, Maryland, sous le nom de ATCC N° 31.478.

Les inhibiteurs d'amylase, le TAI-A et le TAI-B, peuvent être obtenus en inoculant un ensemencement de la couche de *Streptomyces calvus* TM-521 dans un milieu nutritif aqueux, en le cultivant avec agitation ou par un procédé de culture par immersion avec aération, et en séparant les inhibiteurs d'amylase produits, le TAI-A et le TAI-B, à partir du bouillon de culture.

Comme source de carbone assimilable, on utilise de préférence divers hydrates de carbone, tels que l'amidon soluble, l'amidon de maïs, l'amidon de pomme de terre, l'amylopectine et la farine d'avoine. Des sources disponibles d'azote assimilable comprennent un grand nombre de substances telles que la peptone, des amino-acides, la caséine, la farine de poisson, la farine de soja, des extraits de viande, des extraits de levure et diverses autres substances azotées d'origines végétale et minérale. Des produits chimiques tels que l'urée, des nitrates et des composés d'ammonium peuvent être aussi ajoutés au milieu nutritif comme sources d'azote. Dans certains cas, des sels minéraux essentiels, par exemple, le chlorure de sodium, et des agents anti-mousse, par exemple une huile de silicone, peuvent être ajoutés au milieu nutritif. Le milieu nutritif peut contenir 1-10% de préférence 2-5% de source de carbone, 0,1-4% de préférence 0,5-2% de source d'azote, et 0,1-1% de produits minéraux en poids.

Avant la stérilisation, la valeur de pH du milieu est réglée à un pH de 5,5-8,0, de préférence à un pH de 6,6-7,0. La culture est réalisée à une température de 20-40°C pendant 2-5 d, de préférence à une température de 27-35°C pendant environ 3 d. Le développement de la culture est comparativement rapide dans des conditions convenables aérées et immergées, et les substances actives sont détectées dans le bouillon cultivé après 12 h. Chaque production maxima de TAI-A et de TAI-B est ordinairement obtenue après 60-72 h dans une fermentation dans un grand bocal. Les substances actives, le TAI-A et le TAI-B, peuvent être séparées du bouillon cultivé, facilement, comme dans ce qui suit:

Après culture, le bouillon est rassemblé par centrifugation pour retirer les mycéliums. Du carbone actif est ajouté au bouillon à la concentration de 1% pour l'adsorption des substances actives. Après agitation pendant 1 h, le mélange est filtré et la fraction carbonée est traitée par une solution aqueuse de solvant organique tel que l'acétone, du méthanol ou de l'éthanol, pour éluer le mélange de TAI-A et de TAI-B. La solution organique aqueuse est concentrée sous vide. La solution résultante peut être appliquée à la combinaison efficace de chromatographie sur colonne en utilisant une résine échangeuse d'ions telle que les produits dits Amberlite IR-120 (forme H), Amberlite IR-45 (forme OH) et SP-Sephadex C-25 (forme H), une chromatographie sur colonne de gel de silice, une chromatographie sur colonne de cellulose et une filtration sur gel sur le produit dit Sephadex G-15 pour donner respectivement le TAI-A et le TAI-B. Un des exemples de réalisation préférés du mode opératoire d'isolement est le suivant: cette solution aqueuse est appliquée à une colonne du produit dit Amberlite IR-120 (forme H). La colonne est lavée avec de l'eau et puis éluée avec une solution aqueuse 0,1N d'acide chlorhydrique. L'éluat est neutralisé avec une solution aqueuse 2N de soude et dessalé par une chromatographie sur colonne sur du carbone actif. La préparation est purifiée par une chromatographie supplémentaire sur colonne sur le produit dit SP Sephadex C-25 (forme H). Les produits dits TAI-A et TAI-B sont séparés de la solution brute par élution avec une solution aqueuse 0,02N d'acide chlorhydrique. Le TAI-A et le TAI-B sont élués suivant des fractions respectivement entre environ 3,5 et 4,5 fois, et entre 5 et 6 fois le volume de la colonne. On fait passer l'éluat sur

une colonne de produit dit Amberlite IR-45 (forme H). Le TAI-A et le TAI-B purifiés sont obtenus sous forme de poudres blanches par lyophilisation.

Le TAI-A et le TAI-B ont les propriétés physico-chimiques et biologiques suivantes:

a) *Analyse élémentaire:*

TAI-A: C 41,44 H 6,27 N 1,32%

TAI-B: C 42,20 H 6,47 N 2,08%

b) *Poids moléculaire*

Les poids moléculaires du TAI-A et du TAI-B sont estimés respectivement à 950-1050 et 650-700 par chromatographie sur gel sur le produit dit Sephadex G-15 équilibré par un tampon phosphaté M/20 contenant du chlorure de potassium 0,1M, pH 6.8.

Des malto-oligosaccharides (G_2 - G_{10}) sont utilisés comme normes.

c) *Pouvoir rotatoire optique spécifique*

TAI-A: $[\alpha]_D^{25} = +157,3^\circ$ (c=0,5%, eau)

TAI-B: $[\alpha]_D^{25} = +142^\circ$ (c=0,5%, eau)

d) *Spectre d'absorption dans l'infrarouge*

Le spectre d'absorption dans l'infrarouge du TAI-A, déterminé en utilisant une tablette de KBr, présentant des bandes caractéristiques à 3360, 2900, 1635, 1410, 1365, 1230, 1150, 1075, 1020, 925, 850, 760, 700, 570 et 520 cm^{-1} (fig. 1).

Le spectre d'absorption dans l'infrarouge du TAI-B, déterminé en utilisant une tablette de KBr, présente des bandes caractéristiques à 3360, 2920, 1630, 1410, 1365, 1250, 1150, 1075, 1020, 925, 890, 750, 700, 570 et 515 cm^{-1} (fig. 2).

e) *Spectre de résonance magnétique nucléaire*

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du TAI-A et du TAI-B à 60 MHz, dans de l'oxyde de deutérium, sont présentés respectivement sur les fig. 3 et 4.

f) *Solubilité*

Le TAI-A est soluble dans l'eau et dans le diméthylsulfoxyde, et insoluble dans le méthanol, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, le chloroforme, l'acétone et la pyridine.

Le TAI-B est soluble dans l'eau et dans le diméthylsulfoxyde, légèrement soluble dans le méthanol et la pyridine, mais insoluble dans l'éthanol, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'acétone.

g) *Réaction colorée*

A la fois le TAI-A et le TAI-B présentent des réactions positives pour le test de Molisch qui est un test de réaction colorée pour la détection des aldoses, en utilisant l' α -naphtol et H_2SO_4 concentré, et le test à l'anthrone, et leurs hydrolysats acides réagissent positivement avec la ninhydrine.

h) *pKa*

TAI-A: 4,2 (dans l'eau), basique

TAI-B: 4,5 (dans l'eau), basique

i) *Aspect*

Le TAI-A et le TAI-B sont des poudres blanches.

j) *Valeur de Rf*

Les valeurs de Rf du TAI-A et du TAI-B par chromatographie sur couche mince [gel de silice dit 60F254 (Merck)] et par chromatographie sur papier N° 50 (Toyo Roshi Co., Ltd.) sont présentées dans les tableaux II et III.

(Tableaux en tête de la colonne suivante)

k) *Spectre d'absorption dans l'ultraviolet*

Chaque solution aqueuse de 1% de TAI-A et de TAI-B ne montre pas d'absorption caractéristique dans la région ultraviolette à longueurs d'onde 210-360 nm, respectivement.

Tableau II
(TAI-A)

Système de solvants	Valeur de Rf	Chromatographie sur papier	
		Système de solvants	Valeur de Rf
n-Propanol à 65%	0,40	n-Propanol à 65%	0,16
n-Butanol: pyridine: eau (6:4:2,5)	0,21	Pyridine: n-propanol: acide acétique: eau (10:15:3:12)	0,42

Tableau III
(TAI-B)

Système de solvants	Valeur de Rf	Chromatographie sur papier	
		Système de solvants	Valeur de Rf
n-Propanol à 65%	0,46	n-Propanol à 65%	0,28
n-Butanol: pyridine: eau (6:4:2,5)	0,32	Pyridine: n-propanol: acide acétique: eau (10:15:3:12)	0,53

l) *Point de fusion*

Le TAI-A ne présente pas de point de fusion net, étant décomposé à 137-142°C.

Le TAI-B ne présente pas de point de fusion net, étant décomposé à 169-174°C.

m) *Composants*

Le TAI-A et le TAI-B contiennent deux (ou davantage) unités de glucose et une substance basique qui semble être un aminosucre, respectivement.

n) *Activité inhibitrice d'amylase*

Le tableau IV présente le degré d'activité inhibitrice du TAI-A et du TAI-B vis-à-vis de diverses amylases.

Dans ce tableau, l'activité inhibitrice d'amylase vis-à-vis de la gluco-amylase, de l' α -amylase à saccharification bactérienne et de la β -amylase est déterminée par le procédé suivant:

Un mélange de 50 μl de la solution expérimentale d'amylase dans un tampon d'acétate M/20 (pH 5,0) et de 50 μl d'eau est soumis à une pré-incubation à 40°C pendant 10 min, et puis additionné à 400 μl d'une solution d'amidon soluble à 1% dans un tampon d'acétate M/20 (pH 5,0). Après incubation à 40°C pendant 10 min, on retire 100 μl du mélange réactionnel pour la détermination du sucre réducteur libéré selon le procédé de Somogyi-Nelson. Une unité d'activité d'amylase est la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 0,1 mg de glucose/min dans le mélange réactionnel à 40°C.

En outre, le mode opératoire mentionné ci-dessus est réalisé, sauf que 50 μl d'une solution aqueuse d'inhibiteur sont utilisés à la place de 50 μl d'eau. Une unité d'activité inhibitrice d'amylase (UI) est définie comme étant la quantité d'inhibiteur exigée pour inhiber, de 50%, deux unités d'activité d'amylase dans les conditions indiquées ci-dessus.

Le pourcentage de l'activité inhibitrice est mesuré par l'expression suivante:

$$\frac{A-B}{A} \times 100$$

où A est l'unité d'activité d'amylase du mélange réactionnel en l'absence de l'inhibiteur, et B est l'unité d'activité d'amylase du mélange réactionnel en présence de l'inhibiteur.

En outre, l'activité inhibitrice d'amylase, vis-à-vis de l' α -amylase de la salive humaine et de l' α -amylase du pancréas de porc, est déterminée par le procédé mentionné ci-dessus, sauf qu'une solution d'amidon soluble à 1% dans un tampon phosphaté M/15 contenant du chlorure de sodium 0,1M (pH 7,0) est utilisée à la place d'une solution d'amidon soluble à 1% dans un tampon d'acétate M/20, l'activité inhibitrice vis-à-vis de l' α -amylase à liquéfaction bactérienne et de la Taka-amylase est déterminée par l'activité de dextrinisation selon le procédé de Wohlgmuth modifié par Tsujisaka, et l'activité inhibitrice vis-à-vis de la pullulanase est déterminée par le procédé de Kobayashi. L'activité dans ce tableau est déterminée à concentration respectivement de 2 μ g/ml de TAI-A et de 10 μ g/ml de TAI-B dans le mélange réactionnel.

Tableau IV

Amylase	Intensité	
	TAI-A	TAI-B
α -Amylase à liquéfaction bactérienne	—	—
α -Amylase à saccharification bactérienne	+	+
Taka-amylase	+	—
α -Amylase de salive humaine	+	+
α -Amylase de pancréas de porc	+	+
Glucoamylase (<i>Rhizopus niveus</i>)	+	+
α -Amylase (soja)	—	—
Pullulanase (<i>Aerobacter aerogenes</i>)	—	—

— : 0-50% de l'activité inhibitrice d'amylase;

+: plus de 50% de l'activité inhibitrice d'amylase.

o) Effet sur l'hydrolyse d'amidon de la glucoamylase

L'inhibition du TAI-A et du TAI-B est du type non compétitif.

p) Stabilité

La stabilité du TAI-A et du TAI-B dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique et dans une solution aqueuse de soude est déterminée à 100°C en tant qu'activité résiduelle (%) de l'activité inhibitrice de glucoamylase, et les résultats sont présentés sur les fig. 5 et 6. Comme montré sur ces figures, le TAI-A et le TAI-B sont stables et leur activité inhibitrice est maintenue même par chauffage à 100°C pendant 20 min dans une solution aqueuse 0,1N d'acide chlorhydrique ou dans une solution aqueuse 0,001N de soude.

q) Toxicité

La toxicité du TAI-A et du TAI-B est extrêmement faible. Ainsi, ils présentent à peine de toxicité aiguë intraveineuse sur les souris, à une dose inférieure à 1 g/kg de poids corporel. En outre, aucun effet secondaire n'est observé après administration de 1 g/kg/d par voie orale pendant 1 d pour des animaux de laboratoire.

r) Inhibition d'amylase sur les souris

Les techniques expérimentales pour démontrer l'action des inhibiteurs de la présente invention sur les souris sont les suivantes: pour produire de l'hyperglycémie alimentaire, on force des groupes de 6 souris dites ddY (20-22 g) à jeûner pendant 24 h puis on leur donne, par voie orale, 1 g/kg d'un amidon de maïs bouilli sous forme de suspension ou 2,5 g/kg de saccharose sous forme de solution. Les autres groupes de 6 souris de souche ddY (20-22 g) reçoivent, par voie orale, les mêmes hydrates de carbone suivant les mêmes quantités et un inhibiteur (200 UI/mg) de la présente inven-

tion suivant la quantité indiquée. Le niveau de glucose dans le sang est déterminé par intervalles brefs après administration, en utilisant un Auto-Analyseur (type Hitachi 500).

Les tableaux VI et VII montrent l'effet du TAI-A et du TAI-B, respectivement, sur le niveau de glucose du sang des souris ayant jeûné, auxquelles on a administré de l'amidon. Généralement, dans les cas de contrôles et des souris auxquelles on a administré l'inhibiteur, une hyperglycémie temporaire se produit d'abord, le niveau de glucose du sang diminue et, peu à peu, devient nul après 1 h ou à peu près. L'hyperglycémie chez les souris auxquelles on a administré l'inhibiteur (200 ou 1000 UI) de la présente invention s'affaiblit plus rapidement que celle dans les contrôles.

Les tableaux VIII et IX présentent l'effet du TAI-A et du TAI-B, respectivement, sur le niveau de glucose du sang des souris ayant jeûné, auxquelles on a administré du saccharose. Après qu'une hyperglycémie temporaire a été terminée au bout de 15 min, le niveau de glucose du sang revient peu à peu à la normale, et retombe à la valeur initiale après 2 ou 3 h. L'administration de l'inhibiteur (80 ou 2000 UI) de la présente invention affaiblit l'intensité de l'hyperglycémie.

Tableau VI

Temps après l'administration de l'amidon (min)	Glucose du sang (valeur moyenne $\pm$ écart standard) (mg/100 ml)			
	TAI-A (mg/souris)			
	0	0,2	1,0	5,0
5	234 $\pm$ 28	190 $\pm$ 31	169 $\pm$ 14	136 $\pm$ 23
15	220 $\pm$ 16	189 $\pm$ 17	143 $\pm$ 8,2	132 $\pm$ 4,6
30	183 $\pm$ 6,8	167 $\pm$ 21	139 $\pm$ 19	130 $\pm$ 11
60	160 $\pm$ 21	135 $\pm$ 16	123 $\pm$ 17	130 $\pm$ 5,7

Niveau de contrôle: 132 $\pm$ 16 mg/100 ml.

Tableau VII

Temps après l'administration de l'amidon (min)	Glucose du sang (valeur moyenne $\pm$ écart standard) (mg/100 ml)			
	TAI-B (mg/souris)			
	0	0,2	1,0	5,0
5	248 $\pm$ 27	202 $\pm$ 9,1	158 $\pm$ 1,3	136 $\pm$ 29
15	218 $\pm$ 31	178 $\pm$ 22	138 $\pm$ 8,5	128 $\pm$ 19
30	178 $\pm$ 8,6	158 $\pm$ 10	134 $\pm$ 21	130 $\pm$ 11
60	162 $\pm$ 13	130 $\pm$ 16	132 $\pm$ 14	128 $\pm$ 7,2

Niveau de contrôle: 130 $\pm$ 8,2 mg/100 ml.

Tableau VIII

Temps après l'administration de saccharose (min)	Glucose du sang (valeur moyenne $\pm$ écart standard) (mg/100 ml)			
	TAI-A (mg/souris)			
	0	0,4	2,0	10,0
0	102 $\pm$ 9,2	93 $\pm$ 10	98 $\pm$ 5,9	119 $\pm$ 9,5
15	288 $\pm$ 35	154 $\pm$ 27	127 $\pm$ 10	140 $\pm$ 11
30	217 $\pm$ 30	193 $\pm$ 25	185 $\pm$ 41	142 $\pm$ 14
60	198 $\pm$ 23	168 $\pm$ 18	113 $\pm$ 10	109 $\pm$ 12
120	151 $\pm$ 19	142 $\pm$ 11	140 $\pm$ 15	134 $\pm$ 5,4
180	156 $\pm$ 12	159 $\pm$ 9,8	131 $\pm$ 5,2	127 $\pm$ 10

Niveau de contrôle: 122 $\pm$ 18 mg/100 ml.

Tableau IX

Temps après l'administration de saccharose (min)	Glucose du sang (valeur moyenne $\pm$ écart standard) (mg/100 ml)			
	TAI-B (mg/souris)			
	0	0,4	2,0	10,0
0	98 $\pm$ 8,9	89 $\pm$ 5,3	92 $\pm$ 6,4	94 $\pm$ 7,2
15	276 $\pm$ 22	142 $\pm$ 8,5	123 $\pm$ 9,8	118 $\pm$ 12
30	208 $\pm$ 19	194 $\pm$ 23	172 $\pm$ 11	140 $\pm$ 17
60	188 $\pm$ 17	172 $\pm$ 18	123 $\pm$ 22	108 $\pm$ 10
120	162 $\pm$ 23	136 $\pm$ 12	134 $\pm$ 12	128 $\pm$ 7,8
180	148 $\pm$ 19	152 $\pm$ 35	142 $\pm$ 35	134 $\pm$ 19

Niveau de contrôle: 126 $\pm$ 21 mg/100 ml.

D'après les résultats de ces propriétés, il apparaît qu'à la fois le TAI-A et le TAI-B appartiennent au groupe des inhibiteurs d'amylase du type oligosaccharide, et qu'ils diffèrent des inhibiteurs d'amylase connus. Ainsi, ils diffèrent de la Nojirimycine parce qu'elle a un poids moléculaire de 179 et qu'elle a une activité inhibitrice vis-à-vis de la β -glucosidase. Le S-AI diffère du TAI-A et du TAI-B par sa forte activité inhibitrice vis-à-vis de l' α -amylase à liquéfaction bactérienne et par sa nature non adsorbante vis-à-vis des résines acides et basiques échangeuses d'ions. Le TAI-A et le TAI-B sont semblables au NCGAI du fait que tous appartiennent aux oligosaccharides contenant du glucose et sont adsorbés par des résines acides fortes échangeuses d'ions. Cependant, le TAI-A diffère du NCGAI par son poids moléculaire, son activité optique et certaines propriétés biologiques. Ainsi, du NCGAI a un poids moléculaire de 600, n'a pas d'activité optique et ne présente qu'une faible activité inhibitrice vis-à-vis de l' α -amylase de la salive humaine et de l' α -amylase à liquéfaction bactérienne. D'autre part, le TAI-A a un poids moléculaire d'environ 1000 et inhibe fortement l' α -amylase de salive humaine, l' α -amylase à saccharification bactérienne et l' α -amylase du pancréas de porc ainsi que la glucoamylase, mais n'inhibe pas l' α -amylase à liquéfaction bactérienne. Bien que le TAI-B présente presque le même poids moléculaire que le NCGAI, il diffère de NCGAI par son activité optique et par certaines propriétés biologiques. Ainsi, le TAI-B présente une activité optique, mais n'inhibe pas l' α -amylase à liquéfaction bactérienne.

Les inhibiteurs d'amylase dérivés d'aminosucres, par Frommer et collaborateurs, se composent de 4,6-bisdésoxy-4-(1S-(1,4,6/5)-4,5,6-trihydroxy-3-hydroxyméthylcyclohex-2-én-1-yl-amino)- α -D-glucopyranose et d'une ou de plusieurs unités de glucose. Le TAI-A et le TAI-B n'ont pas de groupe méthyle dans leurs molécules, à en juger d'après leur spectre de résonance magnétique nucléaire. En conséquence, ils diffèrent des dérivés d'aminosucres de Frommer et collaborateurs.

Le TAI-A et le TAI-B diffèrent l'un de l'autre par le poids moléculaire et par le degré d'activité inhibitrice vis-à-vis de l' α -amylase de salive humaine, de la Taka-amylase et de l' α -amylase du pancréas de porc.

Les inhibiteurs d'amylase de la présente invention sont convenables pour l'utilisation comme agents thérapeutiques pour les indications suivantes chez les mammifères: l'obésité, l'adiposité, l'hyperlipidémie (artériosclérose), le diabète, le prédiabète, la gastrite, l'ulcère d'estomac, l'ulcère du duodénum et les caries.

Les formes pharmaceutiques prévues par la présente invention comprennent des compositions pharmaceutiques convenables pour l'utilisation orale et parentérale, par exemple des tablettes, des paquets de poudre, des cachets, des dragées, des capsules, des solutions, des suspensions, des formes injectables stériles, des suppositoires, des bougies (dilatateurs) et analogues.

Les diluants à utiliser dans les compositions pharmaceutiques, adaptés pour être transformés en tablettes, en dragées, en capsules et

en pilules, comprenant les produits suivants facultatifs: des produits de charge et des produits d'extension, par exemple l'amidon, le sucre, le mannitol et l'acide silicique; des liants, par exemple la carboxyméthylcellulose et d'autres dérivés de cellulose, des alginates, la gélatine et la polyvinylpyrrolidone; des agents d'humidification, par exemple le glycérol; des agents de désintégration, par exemple l'agar-agar, le carbonate de calcium, et le bicarbonate de sodium; des agents pour retarder la dissolution, par exemple la paraffine; des accélérateurs de résorption, par exemple des composés d'ammonium quaternaire; des agents tensio-actifs par exemple l'alcool cétylique, le monostéarate de glycérol; des supports d'adsorption, par exemple le kaolin et la bentonite; des lubrifiants, par exemple le talc, le stéarate de calcium et de magnésium, et les polyéthylèneglycols solides; des liants élastomères tels que le chicle.

Les compositions pharmaceutiques contiennent de préférence environ 0,1 à 99,5, de préférence environ 0,5 à 99,5% d'inhibiteur en poids par rapport à la composition totale. En plus d'un inhibiteur selon la présente invention, les compositions pharmaceutiques selon la présente invention peuvent aussi contenir d'autres composés à activité pharmaceutique. Ils peuvent également renfermer plusieurs inhibiteurs différents selon la présente invention. Des exemples particuliers d'autres composés à activité pharmaceutique sont des agents oraux anti-diabétiques, tels que des dérivés de sulfonyl-urée- β -cytotropes et des biguanides qui influencent le niveau de sucre du sang.

La dose unitaire préférée pour les médicaments de la présente invention est 10-500 mg, de préférence 20-100 mg par rapport à l'inhibiteur. La dose unitaire peut être administrée aux mammifères oralement une fois ou plusieurs fois par jour, ordinairement immédiatement avant, durant ou après le repas.

L'exemple suivant illustre la production des inhibiteurs de la présente invention.

Exemple

Du *Streptomyces* TM-521, conservé sur une partie inclinée de farine/agar-agar, est inoculé, pour une culture d'ensemencement, dans 500 ml d'une solution nutritive placée en autoclave, contenant 2% de farine d'avoine (pH 6,8) dans un flacon de Sakaguchi de 2 l. La culture d'ensemencement est réalisée à 30°C pendant 48 h avec agitation. 500 ml de l'ensemencement sont transférés dans un dispositif de fermentation de 30 l contenant 20 l du même milieu aqueux stérilisé à 121°C pendant 30 min. La culture dans le dispositif de fermentation est réalisée à 30°C pendant 65 h avec agitation et aération. Le bouillon cultivé est centrifugé pour retirer les mycéliums. 15 l de liqueur surnageante contenant environ 200 000 UI/l d'activité inhibitrice vis-à-vis de la glucoamylase sont obtenus. Dans la liqueur surnageante, on ajoute du carbone activé à la concentration de 1% (en poids/volume). Le TAI-A et le TAI-B sont adsorbés sur du carbone actif, suivi d'une séparation par filtration en un filtrat et en un sédiment de carbone actif. Ce dernier est lavé avec 6 l d'eau et élué avec 4 l d'une solution aqueuse d'acétone à 50%. La fraction active est concentrée à environ 1000 ml sous vide. Ce concentré a $1,5 \times 10^5$ UI/ml. Pour une purification ultérieure, le concentré est appliqué à une colonne de produit dit Amberlite IR-120 (forme H, 4 $\times$ 73 cm). La colonne est lavée avec 3 l d'eau et éluee avec une solution aqueuse 0,1N d'acide chlorhydrique. La fraction active est neutralisée avec une solution aqueuse 2N de soude et dessalée par une chromatographie sur colonne sur du carbone actif. Ensuite, la fraction active est concentrée à environ 1000 ml sous vide. La solution d'inhibiteur est appliquée au produit dit SP Sephadex C-25 (forme H, 4 $\times$ 73 cm) dans une colonne. Les inhibiteurs d'amylase, le TAI-A et le TAI-B, sont adsorbés. La colonne est lavée avec 3 l d'eau et éluee avec une solution aqueuse 0,02N d'acide chlorhydrique. Le TAI-A et le TAI-B sont élués suivant les fractions, respectivement entre environ 3,5 et 4,5 fois et entre 5 et 6 fois le volume de la colonne. Les chromatogrammes d'élution du TAI-A et du TAI-B provenant de la colonne de SP Sephadex C-25 diffèrent l'un de

l'autre. La fraction active de TAI-A et celle de TAI-B sont respectivement passées sur une colonne de produit dit Amberlite IR-45 (forme OH). Chaque éluat actif est concentré à 20 ml dans un évaporateur rotatif et lyophilisé.

Rendement: 400 mg de TAI-A sous forme de poudre blanche à

1300 UI/mg; 300 mg de TAI-B sous forme de poudre blanche à 1900 UI/mg.

La présente invention n'est pas limitée aux exemples de réalisation qui viennent d'être décrits, elle est au contraire susceptible de
5 variantes et de modifications qui apparaîtront à l'homme de l'art.

Fig : 1

TAI_A

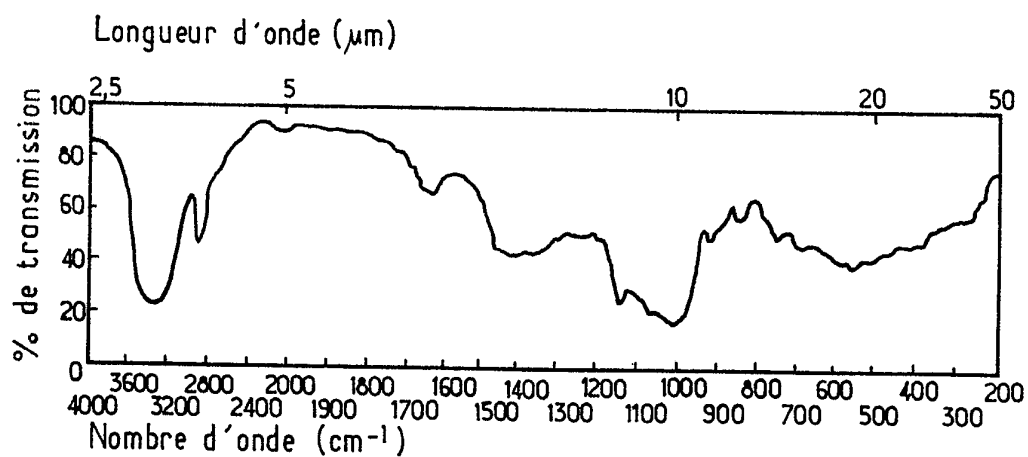


Fig : 2

TAI_B

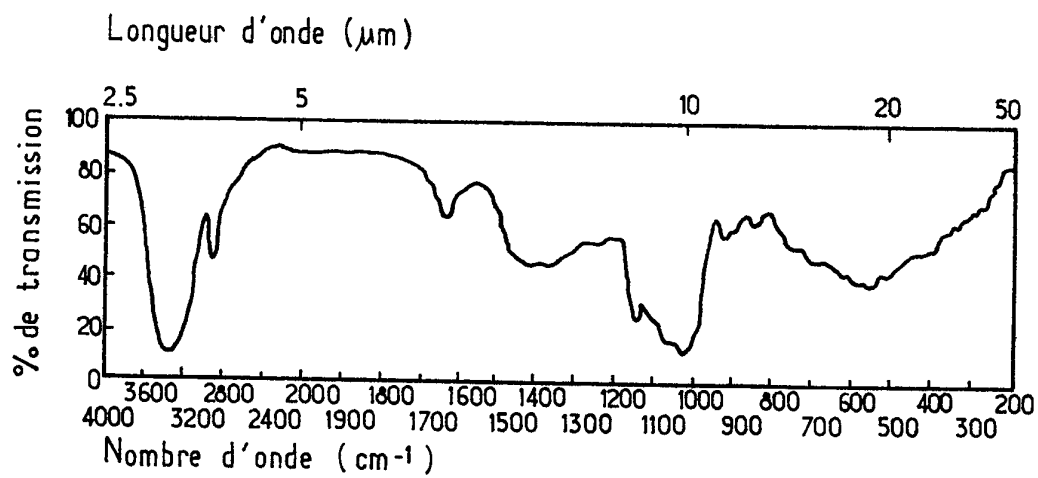


Fig: 3

TAI_A

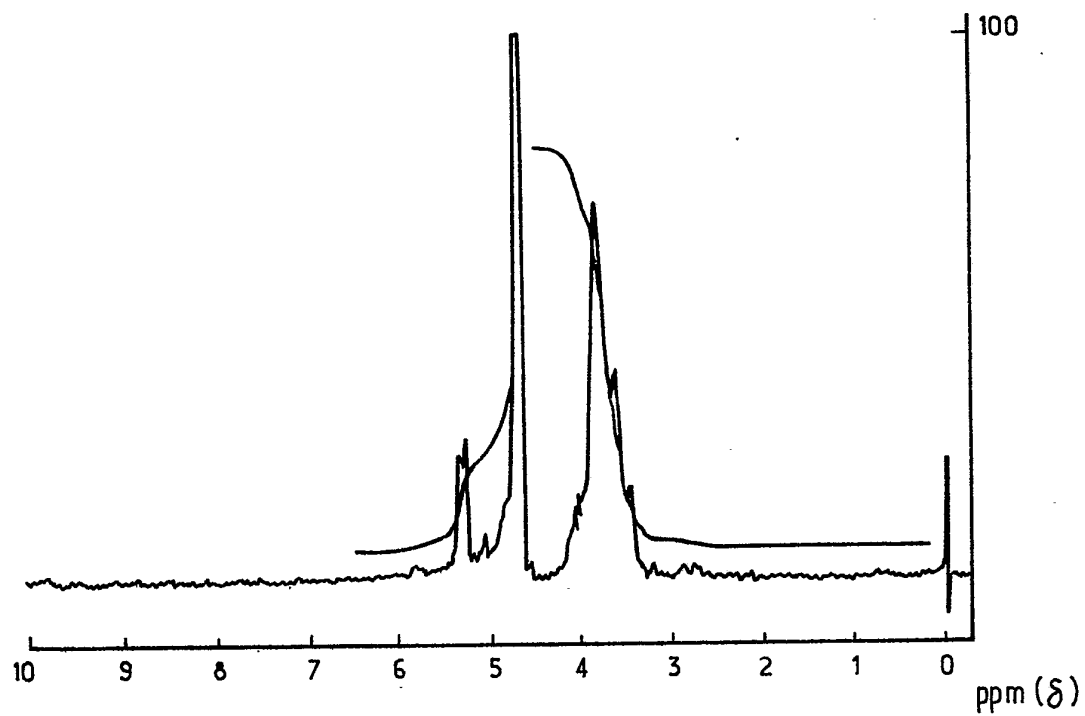


Fig: 4

TAI_B

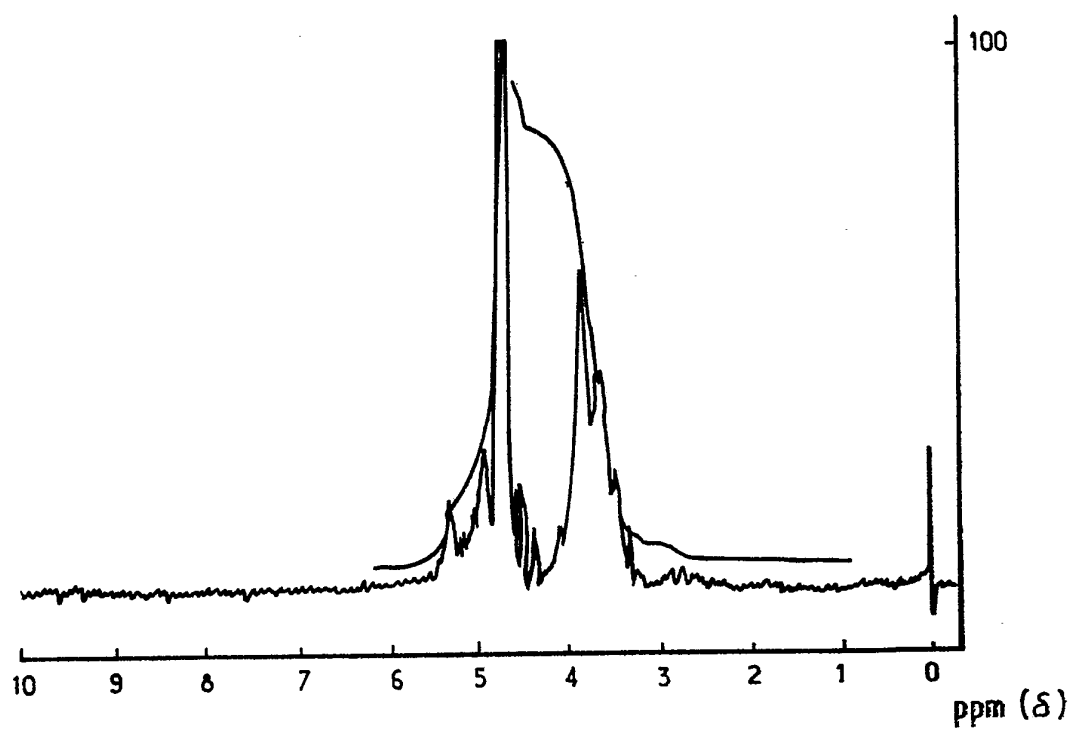


Fig : 5

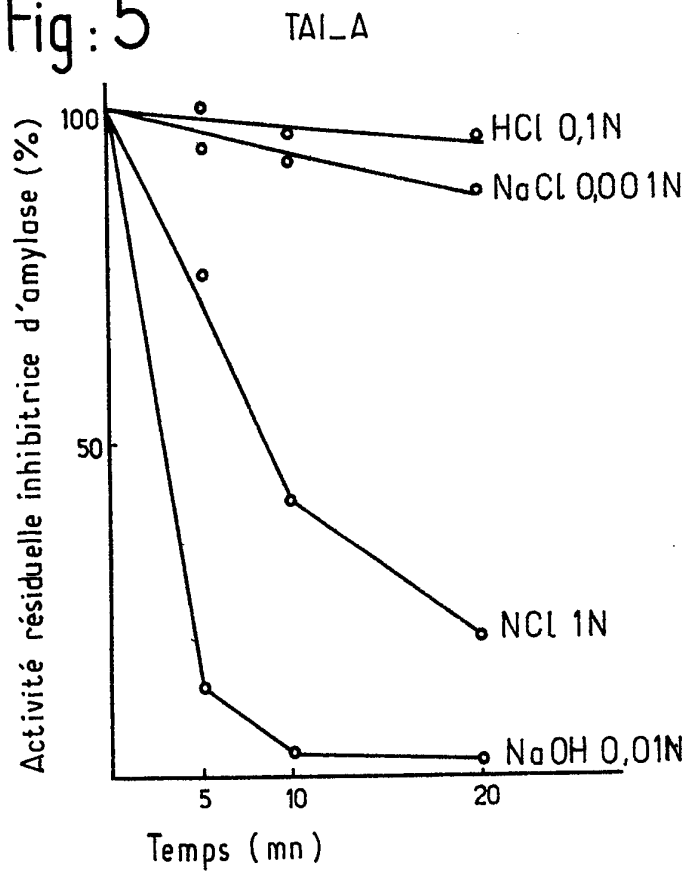


Fig : 6

