



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 222 895 A5

4(51) C 12 P 19/04

## AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 12 P / 265 684 2	(22)	26.07.84	(44)	29.05.85
(31)	58-135982	(32)	27.07.83	(33)	JP

(71) siehe (73)  
 (72) Kawai, Yasuo; Yazawa, Kazunaga, JP  
 (73) Kabushiki Kaisya Advance Kaihatsu Kenkyujo, Tokyo, JP

(54) Verfahren zur Herstellung eines hypotriglyceridemisch aktiven Polysaccharids

(57) Die Erfindung betrifft ein hypotriglyceridemisch aktives Polysaccharid mit den folgenden Merkmalen:

- Spezifischer Drehwert  $[\alpha]_D^{29} = +190,1$  (1,8 Masse-/Vol.-% Lösung)
- Molmasse durch Gelfiltration:  $14000 \pm 3000$
- Zuckerzusammensetzung (Masse-% durch Gaschromatografie): Glukose 70,3; Rhamnose 13,7; Uronsäure 16,0
- Säure-Base-Charakteristika: neutrale Polysaccharide
- Physiologische Charakteristika: ist in der Lage, das Bluttriglycerid bei Säugetieren zu reduzieren.

Dieses hypotriglyceridemisch aktive Polysaccharid kann durch Kultivieren eines Mikroorganismus, der zur Art *Streptococcus* gehört, in einem entsprechenden Kulturmedium dafür hergestellt werden und anschließendes Sammeln des hypotriglyceridemisch aktiven Polysaccharids aus den kultivierten Zellen des Mikroorganismus und/oder dem Überstehenden der Kulturbrühe. Das vorliegende hypotriglyceridemisch aktive Polysaccharid kann als wirksamer Bestandteil einer hypotriglyceridemischen oder antiatherosklerotischen pharmazeutischen Zusammensetzung zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff eingesetzt werden, um eine hypotriglyceridemisch oder antiarteriosklerotische pharmazeutische Zusammensetzung zu bilden, die für die orale Verabreichung bei Säugetieren geeignet ist.

1  
Berlin, den 18. 12. 84

AP C 08 B/265 684 2

64 222 12

## Verfahren zur Herstellung von hypotriglyceridemisch aktiven Polysacchariden

### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Herstellung neuer hypotriglyceridemisch aktiver Polysaccharide (z. B. Triglycerid-reduziertes Polysaccharid, "TRS"), die in Form von pharmazeutischen Zusammensetzungen in der Medizin zur Reduzierung von Bluttriglycerid eingesetzt werden können.

### Bekannte technische Lösungen

Wie aus dem Stand der Technik bekannt, sind bereits verschiedene pharmazeutische Zusammensetzungen, wie Clofibrat und dessen Zubereitungen als Therapeutika für Arteriosklerose oder Hyperlipämie vorgeschlagen worden, die als typische Erkrankungen mittlerer Altersstufen oder als geriatrische Erkrankungen anzusehen sind. Allerdings wurde der gewünschte Zweck durch diese bekannten Medikamente nicht zufriedenstellend erreicht hinsichtlich beispielsweise der pharmakologischen Wirkungen und der Nebenwirkungen.

Vorteilhaft ist der Einsatz mikrobiologischer Verfahren bei der Gewinnung bestimmter Arzneistoffe. Für die vorliegende Erfindung wurde daher auch spezielles mikrobiologisches Schrifttum herangezogen. So befassen sich Autoren in Microbiol. Immunol. Bd. 25(3), 257 - 269 (1981), mit dem ökologischen Status von Streptokokken in menschlichem Stuhl. Es wird über die Verteilung fäkaler Streptokokken als Teil der

Darmflora beim Menschen berichtet. Beobachtet wurden altersbezogene Differenzen bei der Verteilung der Spezies.

In Microbiol. Immunol. Bd. 26(5), 363 - 373, 1982, und in The American Journal of Clinical Nutrition 33, Nov. 1980, S. 2458 - 2461, wird über die Kolonisierung von Milchsäurebakterien berichtet. Dabei wurden verschiedene Kolonisierungsbilder bei verschiedenen Genera beobachtet, auch unter den isolierten Bakterien verschiedener Wirte sowie die Tatsache, daß wenigstens in einigen Fällen vorhandene heimische Streptokokken eine spezifische Adhäsion für die Wirtszellen zeigen.

Die Beziehungen zwischen verschiedenen Enzymaktivitäten und vorhandenen Darmmikroorganismen in Ratten wurde von mehreren Autoren untersucht. Mit der Wirkung der Darmmikroflora auf Enzymwirkungsspiegel in verschiedenen Teilen des Gastrointestinaltrakts beschäftigen sich die Autoren in Infection and Immunity, Bd. 19, Nr. 3, März 1978, S. 771 - 778. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die Aktivitäten verschiedener Enzyme signifikant durch die Darmmikroflora im Verdauungstrakt von Ratten reguliert werden. Aus The American Journal of Clinical Nutrition 32, Jan. 1979, S. 187 - 188 ist als Ergebnis zu entnehmen, daß beim Vergleich keimfreier, üblicher gnotobiotischer Ratten die Enzymaktivität durch lebensfähige Darmmikroben wie beispielsweise Lactobazillus, Staphylococcus, Streptococcus, Bacteroides, Escherichia coli und spindelförmige Bakterien unterdrückt wird.

In Mechanism of Ageing and Development, 16 (1981), 149 - 158

wird der Einfluß von Darmflora und Alter auf den Lipidstoffwechsel und die Aktivität von entsprechenden Enzymen wie Lipoproteinlipase und hormonempfindlicher Lipase untersucht. Veränderungen des Serumtriglycerids, des Serumcholesterols und der Enzymaktivitäten mit dem Alter wurden erforscht und die Wirkung der Darmmikroflora auf diese altersbezogenen Veränderungen. In der gleichen Zeitschrift 17 (1981), 173 - 182 wird darüber berichtet, daß die Veränderung der Darmflora mit dem Alter und spezifische Effekte einiger Bakterien auf die Enzymaktivitäten nicht ganz klar sind.

In keiner dieser genannten Veröffentlichungen wird allerdings auf hypocholesterolämisch aktive Proteine zur Blutcholesterolsenkung eingegangen.

#### Ziel der Erfindung

Es ist Ziel der Erfindung, sichere und wirksame Medikamente für Arteriosklerose oder Hyperlipämie zu entwickeln.

#### Wesen der Erfindung

Eine andere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung eines neuen triglyceridemisch wirkenden Polysaccharids zu entwickeln, wobei diese Verbindung in der Lage ist, das Bluttriglycerid bei Säugetieren effektiv zu reduzieren.

Erfindungsgemäß hergestellt wird ein hypotriglyceridemisch aktives Polysaccharid mit den folgenden Charakteristika:

- a) Spezifische Drehung:  $[\alpha]_D^{29} = +190,1$  (1,8 Masse/Vol-% Lösung)
- b) Molmasse durch Gelfiltration:  $14\ 000 \pm 3\ 000$
- c) Zuckerzusammensetzung (Masse-% durch Gaschromatografie)
- |           |      |
|-----------|------|
| Glukose   | 70,3 |
| Rhamnose  | 13,7 |
| Uronsäure | 16,0 |
- d) Säure-Base-Charakteristik: neutrale Polysaccharide
- e) Physiologische Charakteristika: fähig, das Bluttriglycerid bei Säugetieren zu reduzieren.

Dieses hypotriglyceridemisch aktive Polysaccharid kann hergestellt werden durch Kultivieren eines Mikroorganismus der Art Streptococcus in einem dafür geeigneten Kulturmedium und Sammeln des hypotriglyceridemisch aktiven Polysaccharids aus den kultivierten Zellen des Mikroorganismus und/oder dem Überstehenden der Kulturbrühe. Das vorliegende hypotriglyceridemisch aktive Polysaccharid kann als wirksamer Bestandteil einer hypotriglyceridemischen oder antiarteriosklerotischen pharmazeutischen Zusammensetzung gemeinsam mit dem dafür geeigneten pharmazeutischen Trägerstoff eingesetzt werden, um eine für die orale Verabreichung bei Säugetieren geeignete hypotriglyceridemische oder antiarteriosklerotische pharmazeutische Zusammensetzung zu erhalten.

Es wurde gefunden, daß die neuen Polysaccharide, die man aus

den zur Art Streptococcus gehörenden Mikroorganismen und/oder dem Oberstehenden der Kulturbrühe erhält, wirksam das Bluttriglycerid verringern können und daß dieser Bestandteil, wenn er aus den sogenannten gastrointestinalen Bakterien extrahiert worden ist und aus dem Oberstehenden der Kulturbrühe, bei oraler Verabreichung im wesentlichen nicht toxisch ist.

In der zur Erfindung gehörenden Zeichnung stellen dar:

Fig. 1: Profil eines Infrarot-Absorptionsspektrums des TRS-Polysaccharids der vorliegenden Erfindung,

Fig. 2 Eluierungsbilder der Gelfiltration von Beispiel 1.  
bis 4:

Der in der Produktzubereitung verwendete Mikroorganismus, die Herstellungsverfahren, die physiko-chemischen Charakteristika und die pharmakologischen Wirkungen des TRS-Polysaccharids der vorliegenden Erfindung werden nachfolgend im Detail beschrieben.

### Mikroorganismen

#### 1. Spezies

Die für die vorliegende Erfindung einsetzbaren Mikroorganismen gehören zur Art Streptococcus: Streptococcus faecium, Streptococcus faecialis, Streptococcus bovis, Streptococcus avium, Streptococcus durans, Streptococcus salivarius, Streptococcus mitis, Streptococcus equinus und andere sind bevorzugt.

Typische Beispiele für diese Mikroorganismen wurden beim Fermentation Research Institute (FRI), das eine internationale Hinterlegungsstelle nach dem Budapester Vertrag darstellt, in Japan hinterlegt sowie beim ZIMET in Jena/DDR. Die Hinterlegungsnummern sind in der folgenden Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1

Stämme	Hinterlegungsnummer	
	FRI	ZIMET
Streptococcus faecium	FERM BP - 296	10 976
Streptococcus faecalis	FERM BP- 297	10 977
Streptococcus avium	FERM BP - 298	10 978
Streptococcus salivarius	FERM BP - 299	10 979
Streptococcus durans	FERM BP - 300	10 980
Streptococcus mitis	FERM BP - 301	10 981
Streptococcus equinus	FERM BP - 302	10 982

## 2. Mikrobiologische Charakteristika der Mikroorganismen - Allgemeine mikrobiologische Charakteristika

Die mikrobiologischen Charakteristika der Mikroorganismen der vorliegenden Erfindung sind die gleichen wie jene der bekannten Mikroorganismen, die zur gleichen Art gehören. Daher entsprechen die allgemeinen mikrobiologischen Charakteristika, Kultivierungsverfahren und andere Eigenschaften jenen, die in den folgenden Artikeln beschrieben sind:

- 1) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. Aufl., 490 - 509 (1974)
- 2) Int. J. Syst. Bact. 16, 114 (1966)
- 3) Microbiol. Immunol. 25 (3), 257 - 269 (1981)

- 4) J. Clin. Pathol. 33, 53-57 (1980)  
 5) J. General Microbiol. 128, 713-720 (1982)  
 6) Applied Microbiol. 23 (6), 1131-1139 (1972).

Die typischen mikrobiologischen Eigenschaften der oben genannten Stämme der vorliegenden Erfindung sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Charakteristika	Stämme						
	FERM BP -296	-297	298	299	300	301	302
Form der Zelle	----- sphäroid -----						
Gramfärbung	+	+	+	+	+	+	+
Hämolyse	κ	κ	κ	κ	κ	κ	α
Wachstum bei 10°C	+	+	±	-	+	-	-
Wachstum bei 45°C	+	+	+	±	+	±	+
Wachstum bei 50°C	+	-	-	-	+	-	-
Therm. Resistenz bei 60°f. 30 <sup>1</sup>	+	+	+	-	+	-	-
Wachstum im Kult.med. pH 9,6	+	+	+	-	+	-	-
Fähigk. d. Methylenblareduz.	+	+	-	-	+	-	-
Verflüss. von Gelatine	-	-	-	-	-	-	-
Wachstum im Kult.med.,enth. NaCl (6,5%)	+	+	-	-	+	-	-
Wachstum im Kult.med.,enth. Galle (40%)	+	+	+	-	+	-	+
Produktivität von Ammoniak	+	+	ND <sup>x2</sup>	-	+	±	-
Hydrolyse von Hippursäure	-	±	-	-	+	-	-
Wachstum im Kult.med., enth. Tellurit	-	+	-	ND	-	ND	-
Wachstum im Kult.med.,enth. TTC <sup>+1</sup>	-	+	-	ND	-	ND	-
Säureproduktion aus einer Kohlenstoffquelle							

Forts. Tabelle 2

Charakteristika	296	297	298	299	300	301	302
Säureprod. aus einer Kohlenstoffquelle							
Glukose	+	+	+	+	+	+	+
Eskulin	±	+	+	+	±	ND	+
Inulin	-	-	-	+	-	-	±
Laktose	+	+	+	±	+	±	-
Glycerol	-	+	±	-	-	-	-
Arabinose	+	-	+	-	-	-	-
Melezitose	-	+	±	ND	-	ND	-
Sorbitol	-	+	+	-	-	-	-
Antigengruppen	D	D	Q(D)	K	D	-	D

<sup>+</sup>1 : 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

<sup>x</sup>2 : nicht durchgeführt

### 3. Kultivierungsverfahren

Die Mikroorganismen können in konventioneller Weise kultiviert werden. Beispielsweise können die bakteriellen Zellen durch stationäre Kultivierung in einem Rogosa Kulturmedium gesammelt werden, wobei das Medium die folgende Zusammensetzung unter aeroben Bedingungen hat. Die Zellen können durch Zentrifugieren der Kultur geerntet werden.

#### Zusammensetzung des Rogosa-Kulturmediums

Trypticase	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
Tryptose	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g

Triammoniumcitrat	2 g
Tween 80	1 g
Glukose	20 g
Cysteinhydrochlorid	0,2 g
Salzlösung $x_1$	5 ml
Destilliertes Wasser	bis 1 Liter
(pH 7, Hitzesterilisation bei 121 °C für 15 Minuten)	
$x_1 = \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11,5 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,68 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,4 g
Destilliertes Wasser	100 ml

#### Herstellung des TRS-Polysaccharids

Im folgenden wird ein Beispiel eines typischen Herstellungsverfahrens des TRS-Polysaccharids der vorliegenden Erfindung gegeben:

##### 1. Sammlung der Mikroorganismen

Jeder der oben aufgeführten mikrobiellen Stämme wird in einem Rogosa Kulturmedium geimpft und ohne Rühren bei 37 °C über 5 bis 10 Stunden unter aeroben Bedingungen inkubiert, wobei man eine entsprechende Kulturbrühe mit einer gewissen lebensfähigen bakteriellen Zellkonzentration erhielt. Die Kulturbrühe wurde kontinuierlich bei 12 000 U/min zentrifugiert und die gewonnenen Bakterienzellen zwei bis dreimal in Salzlösung (0,85% NaCl) gewaschen.

##### 2. Aufspaltung der Bakterienzellen

a) Die gewaschenen Zellen wurden in physiologischer Salzlösung suspendiert und zur Aufspaltung bei 115 °C über 10 Minuten wärmebehandelt.

b) Die gewaschenen und in physiologischer Salzlösung suspendierten Bakterienzellen wurden durch Zerschallung (15 KC, 60 min), French press und andere übliche Verfahren aufgespalten.

### 3. Entfernung von Fett aus der Zelle

Die aufgespaltene Zellsuspension wird mit Chloroform-Methanol (2:1, Vol/Vol) vermischt. Die Komponenten, die durch das organische Lösungsmittel extrahierbar sind, wurden dann vollständig durch Zentrifugieren bei 3 000 U/min über 10 min entfernt und die Chloroformschicht verworfen.

### 4. Behandlung mit proteolytischen Enzymen

Die wie oben aufgeführt entfettete Probe wurde mit proteolytischen Enzymen wie Pronase, Trypsin und Pepsin nach üblichen Verfahren behandelt. Von diesen proteolytischen Enzymen ist Pronase für den Zweck am geeignetsten. Die Bedingungen für die Behandlung mit diesen Enzymen sind in "Methods in Enzymology" Bd. VIII, S.26 (1966) beschrieben.

### 5. Reinigung

Das zentrifugierte Überstehende des proteolytischen Reaktionsgemisches wurde mit Fällungsmitteln wie Trichloressigsäure oder Ammoniumsulfat versetzt, um die Proteinfraction auszufällen und zu entfernen. Die überstehende Fraktion wurde dann mit entsprechenden Nukleasen oder proteolytischen Enzymen behandelt, um die Nukleinsäurebestandteile wie DNS und RNS oder Proteine in der Fraktion zu entfernen. Nach diesen enzymatischen Behandlungen wurde wiederholt dialysiert.

Die teilweise gereinigte Fraktion wurde anschließend einer Wiederholung weiterer Reinigungsprozeduren wie Gelfiltration und Säulenchromatografie unterworfen und schließlich erhielt man eine reine Form des Polysaccharids, das als TRS-Polysaccharid bezeichnet wurde.

Im allgemeinen kann dieses TRS-Polysaccharid mit seinen physikochemischen Charakteristika, wie sie oben aufgeführt sind, durch viele der Isolierungs- und Reinigungsverfahren

hergestellt werden, die im Fachgebiet weitgehend eingesetzt werden, wie Fällung-Lösung und Extraktion, Lösungsmittel-extraktion, Dialyse, Säulenchromatografie, Elektrophorese, Gelfiltration oder irgendeine Kombination dieser Verfahren. Die vorliegende Erfindung ist daher auf kein spezielles Verfahren beschränkt.

Die Zubereitung der vorliegenden Erfindung ist bezogen auf die Zubereitungsverfahren hypotriglyceridemisch aktiver Produkte, die aus einem Polysaccharid bestehen und durch Mikroorganismen erhalten werden, die zur Art Streptococcus gehören, da die pharmakologische Wirksamkeit in der Polysaccharidfraktion gefunden wurde. Das wird in detaillierter Form in jedem der folgenden Beispiele beschrieben.

Es ist zu beachten, daß hypotriglyceridemische Wirksamkeit im Überstehenden der Kulturbrühe etwa  $\frac{1}{5}$  von der in der Bakterienzelle beträgt.

#### Physikochemische Charakteristika des TRS-Polysaccharids

Die physikochemischen und physiologischen Charakteristika des TRS-Polysaccharids der vorliegenden Erfindung sind folgende.

##### 1. Chemische Natur und Löslichkeitseigenschaften

Die pulverisierte Probe, die man nach dem Entsalzen und Gefriertrocknen erhielt, war ein nicht-hygroskopisches weißes Pulver mit hoher Löslichkeit ( $\approx 100$  mg/ml) in Wasser aber nur teilweiser Löslichkeit in Ethanol, Methanol und Aceton und Unlöslichkeit in Ether und Chloroform.

##### 2. Molmasse

Die Molmasse des Polysaccharids (TRS) wurde auf 14 000  $\pm$  3 000 nach Gelfiltration geschätzt, mit verschiedenen Dextranen als Vergleichsmaßstab, die eine unterschiedliche Molmasse aufwiesen, unter Verwendung einer Toyopearl HW 55-

Säule, versehen mit einem 25 mM tris-HCl-Puffer, der 0,3 M NaCl (pH 7,5) enthielt.

### 3. Spezifische Drehung

Die spezifische Drehung des genannten TRS-Polysaccharids in 1,8 Masse/Vol%iger Lösung,  $[\alpha]_D^{29}$ , beträgt +190,1 (Dextro-rotation), bestimmt mittels eines Polarimeters DIP-4.

### 4. Zuckerzusammensetzung

a) Vier mg der Probe wurden mit 0,2 M TFA (Trifluoressigsäure) bei 100 °C 7 Stunden behandelt; die Probe wurde mit 0,2 ml Hexamethyldisilazan (20% Vol/Vol in Pyridin) und 0,02 ml Trimethylchlorsilan vermischt, 15 Minuten gerührt und nach Stehenlassen über 5 Minuten gaschromatisch untersucht, um Glukose, Rhamnose usw. zu bestimmen. Die Trennungssäulentemperatur betrug 179 °C. Uronsäure usw. wurde über die Carbazol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Methode (modifizierte Bitter-Muir-Methode; Bitter, T. und Muir, H. Anal. Biochem. 4, 330 (1962) bestimmt. Die Zuckerzusammensetzung des Polysaccharids war: Glukose 70,3 %, Rhamnose 13,7 % und Uronsäure 16,0 %.

### 5. Säure-Base-Charakteristik

Der pH-Wert der 0,1 und 0,5 %igen Lösung des TRS-Polysaccharids betrug 6,71 .

### 6. Infrarot-Absorptionsspektrum

Das Infrarot-Absorptionsspektrum des TRS-Polysaccharids, gemessen mit einem Infrarotspektrometer (Modell JASCO A-302) ist aus Fig. 1 zu entnehmen, worin die Abszisse und die Ordinate die Wellenzahl und die Prozente Transmission (Durchlässigkeit) angeben.

### 7. Elementaranalyse

Eine Elementaranalyse mittels eines Elementaranalysators

(Modell 240 B, Perkin-Elmer) führte zu folgendem Ergebnis: C 37,2 %, H 6,4 % und /O 56,4 % beim TRS-Polysaccharid. Die Summenformel ist  $C_{31}H_{64}O_{35}$ .

### 8. Schmelzpunkt

Der Schmelzpunkt des TRS-Polysaccharids lag bei 235 bis 241 °C, gemessen mit einem Schmelzpunktgerät Modell Yanaco MP-3.

### 9. Physiologische Charakteristika

Das TRS-Polysaccharid ist bei der Reduzierung des Bluttriglyceridspiegels in Säugetieren wirksam, wenn es oral verabreicht wird. Diese Aktivität ist im Bereich von wenigstens -80 °C bis 115 °C und bei pH 4,1 bis 11 stabil, wenn das TRS-Polysaccharid gelagert wird.

## Pharmakologische Wirkungen des TRS-Polysaccharids

### 1. Pharmakologische Effekte

Wie aus jedem folgenden Beispiel hervorgeht, ist das vorliegende antiarteriosklerotische Pharmazeutikum mit dem TRS-Polysaccharid der vorliegenden Erfindung bei der Reduzierung des Bluttriglyceridspiegels in Säugetieren außerordentlich wirksam. Dementsprechend ist dieses Pharmazeutikum ein nützliches therapeutisches oder vorbeugendes Medikament für Krankheiten aus dem Bereich Arteriosklerose, Hyperlipidämie, Hyperlipoproteinämie, Xanthomatose, Cholezystolithiasis, Hypertension, Diabetis und andere.

Die erfindungsgemäße Zubereitung kann Säugetieren auf oralem, intraperitonealem und intravenösem Wege sowie auf anderen Wegen verabreicht werden. Die Menge pro Dosiseneinheit liegt bei etwa 1 µg bis 0,5 g/kg Körpermasse. Bevorzugt ist die orale Gabe bei etwa 0,01 bis 100 mg/kg Körpermasse. Für die vorliegende Erfindung kann eine beliebige Arzneimittelform

gewählt werden, sie kann eingesetzt werden als Lösung in physiologischer Kochsalzlösung und anderen, Injektionen, als pulverförmiges Lyophilisat oder auf andere Weise in Pulverform überführt, als Suppositorien, als mit einer  $\phi$  Schutzhülle überzogene Tabletten, als sublinguale Tabletten, als Granulate, Tabletten, Kapseln usw. mit entsprechenden Trägerstoffen, verdünnenden Basen, Verdünnungsmitteln usw.

## 2. Akute Toxizität

Wie aus den nachfolgenden Beispielen hervorgeht, liegt die  $LD_{50}$  des TRS-Polysaccharids der vorliegenden Erfindung bei mehr als 1 200 mg/kg Körpermasse, wenn es der Maus intraperitoneal verabreicht worden war. Das bedeutet, daß die Substanz bei oraler Gabe im wesentlichen nicht toxisch ist.

### Beispiele

Die Erfindung wird nun durch Beispiele weiter erläutert, die jedoch keine Beschränkung darstellen sollen.

#### Beispiel 1 - Herstellung und Reinigung des TRS-Polysaccharids

Streptococcus faecium FERM BP-296 wurde geimpft in 2 l Rogosa Kulturmedium bei einer Endkonzentration von  $1 \times 10^6$  Bakterien/ml. Das geimpfte Medium wurde bei  $37^\circ\text{C}$  10 Stunden ohne Rühren unter aeroben Bedingungen inkubiert, wobei man  $10^9$  Bakterien/ml Kulturbrühe erhielt. Die Bakterienzellen wurden durch kontinuierliches Zentrifugieren bei 12 000 U/min gewonnen, mit physiologischer Kochsalzlösung (0,85% NaCl) gewaschen und in derselben Lösung suspendiert, um 100 ml der Zellsuspension bei einer Konzentration von  $2 \times 10^{10}$ /ml zu erhalten.

Die oben genannte Bakterienzellsuspension wurde bei  $115^\circ\text{C}$  über 10 Minuten wärmebehandelt und dreimal mit Chloroform-

Methanol (2:1, Vol/Vol) behandelt, um Fette zu entfernen.

Die entfettete bakterielle Suspension wurde mit 3 000 U/min 10 Minuten zentrifugiert, und die untere Schicht, d.i. die Chloroformschicht, wurde verworfen. Die wäßrige Schicht wurde als Ausgangsmaterial in den folgenden Reinigungsschritten eingesetzt.

Das Ausgangsmaterial wurde dann mit 20 mg Pronase (Sigma-Protease Typ XIV) in 100 ml Phosphatpuffer (pH 7,8) versetzt, der 0,0015 M  $\text{CaCl}_2$  enthielt, bei 47 °C über 24 Stunden. Es erfolgte eine weitere Behandlung mit 10 mg Pronase unter den gleichen Bedingungen. Die experimentellen Bedingungen der Behandlung mit Pronase sind in "Methods in Enzymology" Bd. VIII S. 26 (1966) aufgeführt.

Das mit Pronase behandelte Material wurde durch Zentrifugierung bei 3000 U/min über 10 Minuten in die ausgefällte und die überstehende Fraktion getrennt. Die überstehende Fraktion wurde mit  $\frac{1}{9}$  Volumen 100%iger (Masse/Vol) Trichloroessigsäure (TCA) versetzt, bei 4 °C über 3 Stunden unter Rühren stehen gelassen und dann mit 3000 U/min 10 Minuten zentrifugiert, wobei man die ausgefällte und die überstehende Fraktion erhielt. Die ausgefällte Fraktion wurde mit dem gleichen Volumen 10%iger TCA versetzt und das gleiche Verfahren wiederholt. Das erhaltene Überstehende wurde dreimal mit Ethylether zwecks Entfernung von TCA gewaschen, in 50ml destilliertem Wasser gelöst, mit 1 N NaOH neutralisiert, zur vollständigen Entfernung von TCA dialysiert und schließlich lyophilisiert, wobei man 258 mg (Trockenmasse) der überstehenden Fraktion erhielt.

Die erhaltene überstehende Fraktion wurde mit der oben beschriebenen Pronase behandelt und dialysiert, um zu 176 mg (Trockenmasse) der dialysierten Fraktion zu gelangen (MW

> 3500). Die dialysierte Fraktion wurde als Reinigungsfraktion I bezeichnet.

Die genannte Reinigungsfraktion I wurde über einen Sephadex G-100-Säulenchromatographen fraktioniert, der 0,05 M Tris-HCl-Puffer enthielt. Das Säulenchromatogramm der Reinigungsfraktion I bei einer Eluierungsrate von 1 ml/min ist aus Fig. 2 zu entnehmen; die Abszisse weist das Eluierungsvolumen (ml) und die Ordinate die Konzentration der eluierten Substanz ( $\mu\text{g/ml}$ ) auf. Eine Fraktion nach 124 ml wurde gesammelt und als Reinigungsfraktion II bezeichnet (93,6 mg Trockenmasse).

Fig. 3 zeigt ein Säulenchromatogramm der Reinigungsfraktion II bestimmt mit einer Toyopearl HW-55F-Säule, ausgerüstet mit einem 25 mM Tris-HCl-Puffer, der 0,3 M NaCl enthielt. Die Eluierungsrate betrug 1 ml/min. In Fig. 3 stellen die Kurven 1, 2 und 3 die entsprechenden Eluierungsprofile von Zucker, Protein und Nukleinsäure dar.

Das gereinigte TRS-Polysaccharid (87,9 mg Trockenmasse) wurde isoliert durch Sammeln des Teiles, der in 80 bis 100 ml Fraktionen eluiert wurde.

Fig. 4 zeigt das Säulenchromatogramm des TRS-Polysaccharids unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie sie in Fig. 3 zu sehen ist. Die physikochemischen Charakteristika des TRS-Polysaccharids sind oben aufgeführt.

Tabelle 3 zeigt die Ausbeute und die Mengen an Protein, bestimmt nach dem Lowry-Verfahren, RNS nach dem Orcinol-Verfahren, DNS nach dem Diphenylamin-Verfahren und Zucker nach dem Phenol- $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Verfahren in jedem Herstellungsverfahren. Die Werte in der Tabelle weisen die Trockenmasse (mg) der Ausbeute und die Masse% der chemischen Bestandteile aus.

Tabelle 3

Fraktionen	Ausbeute	Protein	RNS	DNS	Zucker	Spezif. Aktivität
Überstehendes	258	14,1	1,8	Sp.	76,3	7,1
Reinigungsfrakt. I	176	2,8	1,6	Sp.	95,6	10,2
Reinigungsfrakt II	93,6	2,1	0,9	Sp.	97,0	12,3
TRS-Polysaccharid	87,9	Sp.	Sp.	Sp.	100	23,0

Sp. = Spuren

Die spezifische Aktivität, die in Tabelle 3 ausgewiesen wird, zeigt die relative Aktivität der Triglyceridreduktion bei jeder Fraktion bei gewöhnlichen Ratten pro Masseeinheit an, wobei die der wärmebehandelten Bakterienzellen, die oben genannt wurden, 1 ist. Assayverfahren für die Triglycerid-reduzierende Aktivität in Tierexperimenten sind weiter unten in Beispiel 2 ausgeführt.

Es wurde bestätigt, daß das TRS-Polysaccharid von den anderen Bakterienstämmen, die in Tabelle 1 aufgeführt sind, ebenso wie in diesem Beispiel abgetrennt und gereinigt werden kann, jedoch mit leichten Unterschieden in der Ausbeute.

## Beispiel 2 Pharmakologische Wirkung des TRS-Polysaccharids

### 1. Hypotriglyceridemische Aktivität (1)

Proben mit physiologischer Kochsüßlösung, die das Äquivalent von 16 mg/kg Körpermasse des lyophilisierten TRS-Polysaccharids enthielten, wurden hergestellt. Diese Proben wurden bei einer täglichen Dosis von 1ml gewöhnlichen Ratten (18 Wochen alt, männlich, durchschnittliche Körpermasse 246 g, 10 Ratten pro Gruppe) oral verabreicht sowie gewöhnlichen und (Krankheits)keimfreien Mäusen (18 Wochen alt, männlich,

durchschnittliche Körpermasse 30 g, 10 Mäuse pro Gruppe). Die Ratten und Mäuse wurden 8 bis 12 Wochen aufgezogen. Dann wurde von der Abdominalaorta dieser Tiere Blut gesammelt und von dem Gesamtblut Serumproben durch Zentrifugieren abgetrennt. Mit dem Triglycerid TG WAKO (Acetylacetonverfahren) wurde dann der Triglyceridspiegel bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die in der Tabelle aufgeführten Werte stellen die Reduktionsrate (%) von den Werten der Kontrollgruppe dar, denen keine Probe dosiert worden ist. Die Zusammensetzung (Masse%) der Diät, die nach Belieben gegeben wurde, ist aus Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 4

Tiere	Reduktionsrate (%)
Gewöhnliche Ratten (12 Wochen)	40,5
Gewöhnliche Mäuse ( 8 Wochen)	45,1
keimfreie Mäuse ( 8 Wochen)	39,6

Tabelle 5

Zusammensetzung	Masseprozent
Kasein	20
Sojabohnenöl	10
Weizenstärke	61
Minerale	4
Vitamingemisch	2
pulverisiertes Filterpapier	3

## 2. Hypotriglyceridemische Aktivität (2)

Die oben genannten Gaben wurden oral verabreicht bei einer täglichen Dosis von 1 ml bei gewöhnlichen Ratten (18 Wochen alt, männlich, durchschnittliche Körpermasse 238 g, 15 Ratten pro Gruppe) und gewöhnlichen keimfreien Mäusen (18 Wochen alt, männlich, durchschnittliche Körpermasse 31 g, 10 Mäuse pro Gruppe) über 4 Wochen verabreicht. Der Bluttriglyceridspiegel wurde wie oben genannt bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 genannt.

Die Begriffe "Cholesterinzusatz" und "Fruktosezusatz" bedeuten die Zugabe von 1 % Cholesterol zur oben genannten Diät und den Ersatz von Fruktose für die Gesamtmenge an Weizenstärke in der oben genannten Diät. Die Werte in der Tabelle stellen die Reduktionsrate (%) dar, gemessen an den Werten der Kontrollgruppe ohne Dosierung.

Tabelle 6

Tiere	Reduktionsrate (%)
keimfreie Mäuse $x_1$	45,4
gewöhnliche Mäuse $x_1$	41,6
gewöhnliche Ratten $x_1$	43,2
gewöhnliche Ratten $x_2$	42,0

$x_1$  = Diät mit Cholesterinzusatz

$x_2$  = Diät mit Fruktosezusatz

## 3. Hypotriglyceridemische Aktivität (3)

Physiologische Kochsalzproben, die 4 mg/ml TRS-Polysaccharid enthielten, wurden mit einer täglichen Dosis von 1 ml pro Ratte über 2 Wochen hyperlipidämischen Ratten (18 Wochen alt, männlich, durchschnittliche Körpermasse 250 g,

5 Ratten pro Gruppe) verabreicht, die mit einer Cholesterinzusatzdiät gefüttert wurden. Der Bluttriglyceridspiegel wurde wie oben beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 7 zu entnehmen. Der Wert der Verabreichungsgruppe ist die Triglyceridrate (Reduktion) in % zur Kontrollgruppe ohne Dosierung.

Tabelle 7

<u>Tiere</u>	<u>Reduktionsrate (%)</u>
mit Verabreichung	45,0
Kontrolle	0

#### 4. Dosisabhängigkeit

Physiologische Kochsalzproben, die 0,1 mg bis 20 mg/ml TRS<sup>1</sup> Polysaccharid enthielten, wurden oral bei einer täglichen Dosis von 1 ml pro gewöhnliche Ratte (6 Wochen alt, männlich, durchschnittliche Körpermasse 216 g, 5 Ratten pro Gruppe) über 4 Wochen verabreicht. Der Bluttriglycerinspiegel wurde wie oben beschrieben bestimmt (bei der Kontrollgruppe erfolgte keine Dosierung). Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8

<u>Dosis (mg/Ratte)</u>	<u>Reduktionsrate (% Durchschn.)</u>
Kontrolle	0
0,1	< 10,0
1	17,4
10	43,0
20	48,2

## 5. Akute Toxizität

Physiologische Kochsalzproben (0,5 ml/Maus), die 1, 10 und 100 mg des TRS-Polysaccharids enthielten, wurden intraperitoneal IRC-Mäusen verabreicht (6 Wochen alt, durchschnittliche Körpermasse  $31,6 \pm 0,6$  g, 10 Mäuse pro Gruppe). Die thanatobiologische Beobachtung der Mäuse wurde über 14 Tage durchgeführt. Die Kontrollsubstanz war physiologische Kochsalzlösung.

Die  $LD_{50}$ -Werte, berechnet nach der Behrens-Kärber-Methode, lagen bei mehr als 1200 mg/kg Körpermasse. Die Substanz war nichttoxisch bei oraler Gabe.

## 6. Pharmazeutische Zubereitungen

(1) Eine 25 g-Menge des gereinigten TRS-Polysaccharids wurde gleichmäßig mit 275 mg gereinigtem Stärkepulver vermischt und Tabletten für die orale Verabreichung geformt. Jede Tablette entsprach einer Dosis von  $10^{10}$  wärmebehandelten Zellen pro kg Körpermasse für einen Erwachsenen mit einer Körpermasse von 50 kg.

(2) Das TRS-Polysaccharid wurde gleichmäßig mit verdünnenden Basen wie Kalziumkarbonat, Lactose usw., Gleitmitteln wie Stearinsäure, Talkum usw. und anderen Additiven vermischt und die Tabletten dann für die orale Verabreichung geformt. Die tägliche Dosis des TRS-Polysaccharids liegt üblicherweise bei 0,1 mg bis 100 mg/kg Körpermasse.

(3) Das TRS-Polysaccharid (900 mg) wurde suspendiert und gelöst in destilliertem Wasser (30 ml), mit Sirup gesüßt und dann ein Sirup hergestellt.

### Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung eines hypotriglyceridemisch aktiven Polysaccharids, das in der Lage ist Bluttriglycerid in Säugetieren zu reduzieren und folgende Merkmale aufweist:

- a) Spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{29} = +190,1$  (1,8 Masse/Vol% Lösung)
- b) Molmasse durch Gelfiltration 14 000 + 3 000
- c) Zuckerzusammensetzung (Masse% durch Gaschromatografie) Glukose 70,3; Rhamnose 13,7; Uronsäure 16,0
- d) Säure-Base-Charakteristika: neutrale Polysaccharide,

gekennzeichnet dadurch, daß ein Mikroorganismus der Art Streptococcus in einem entsprechenden Kulturmedium dafür kultiviert wird und das hypotriglyceridemisch aktive Polysaccharid aus den kultivierten Zellen des Mikroorganismus und/oder dem Überstehenden der Kulturbrühe gesammelt wird.

2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß der Mikroorganismus wenigstens ein solcher ist, der aus der aus *S. faecium*, *S. faecalis*, *S. avium*, *S. bovis*, *S. salivarius*, *S. durans*, *S. mitis* und *S. equinus* bestehenden Gruppe ausgewählt wurde.
3. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß der Mikroorganismus wenigstens ein Stamm ist, der aus der aus *S. faecium* FERM BP-296 (ZIMET 10 976), *S. faecalis*

FERM BP-297 (ZIMET 10 977), *S. avium* FERM BP-298 (ZIMET 10 978), *S. salivarius* FERM BP-299 (ZIMET 10 979), *S. durans* FERM BP-300 (ZIMET 10 980), *S. mitis* FERM BP-301 (ZIMET 10 981) und *S. equinus* FERM BP-302 (ZIMET 10 982) bestehenden Gruppe ausgewählt wurde.

4. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das hypotriglyceridemisch aktive Polysaccharid durch Aufspaltung der Zellen des aus der Kulturbrühe gewonnenen Mikroorganismus gesammelt wird und die Polysaccharidfraktion davon abgetrennt wird.
5. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das hypotriglyceridemisch aktive Polysaccharid aus dem Oberstehenden der Kulturbrühe gewonnen wird durch Abtrennen einer Polysaccharidfraktion davon.

Hierzu **4** Seiten Zeichnungen

Fig. 1

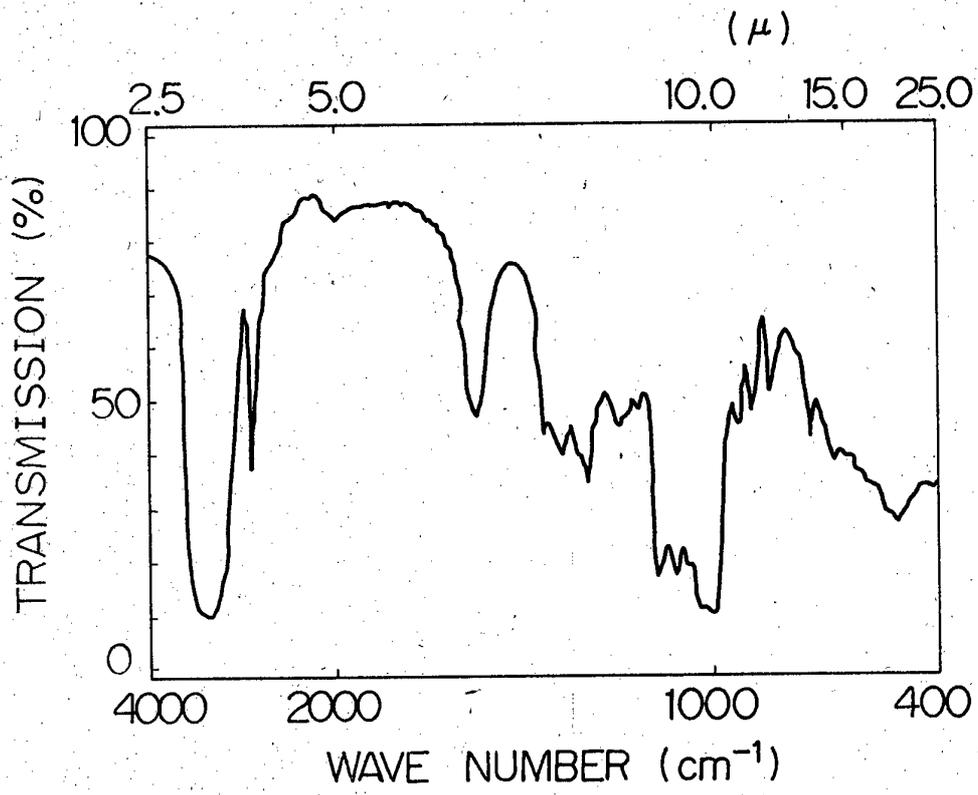
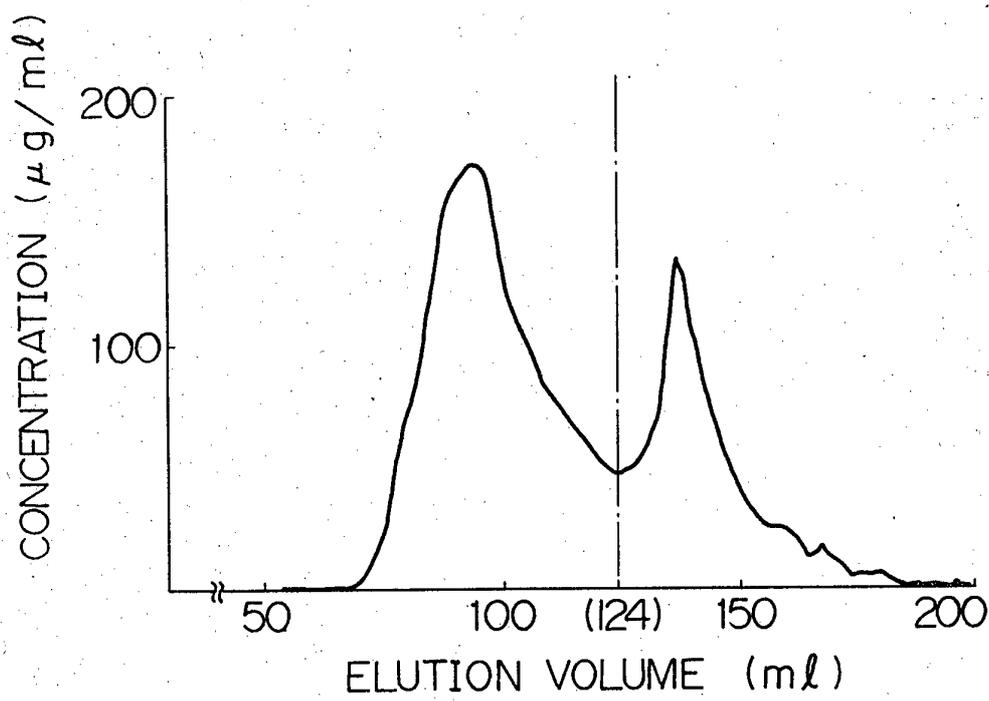


Fig. 2



3

Fig. 3

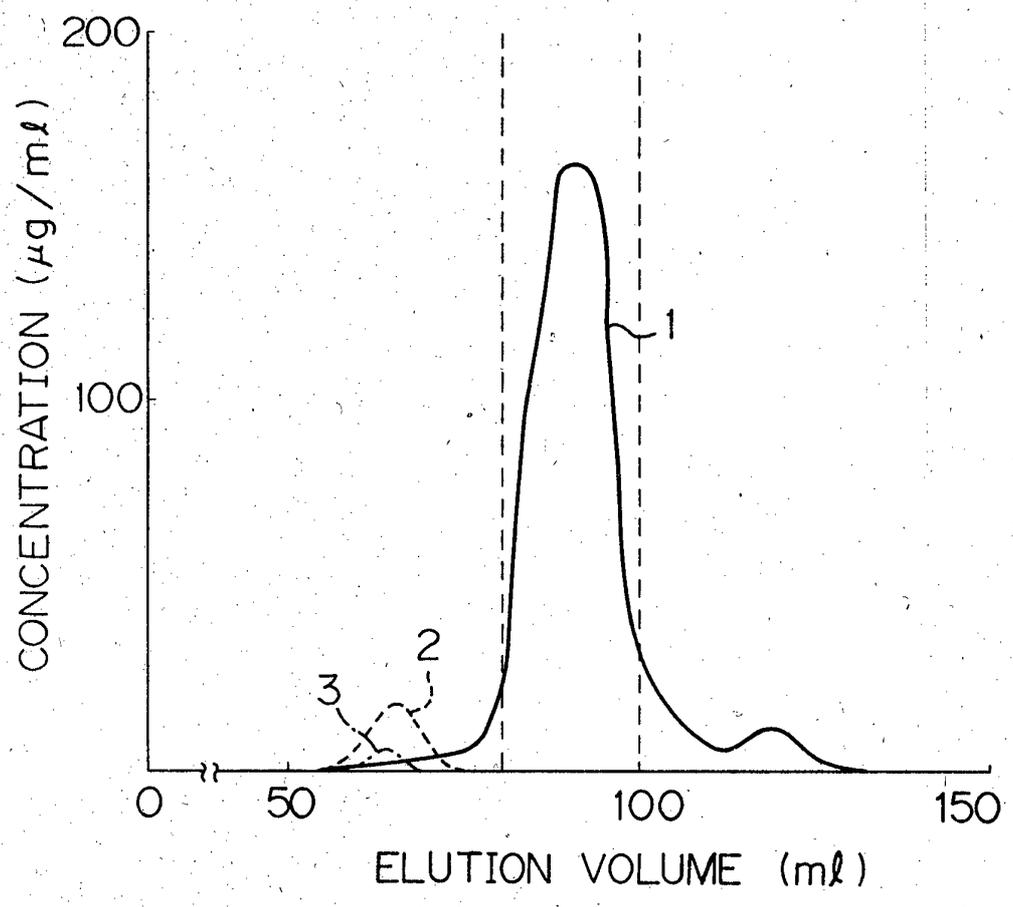


Fig. 4

