

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

②

N° 80 20374

⑤4 **Nouvel antibiotique utile comme agent d'inhibition de l'activité enzymatique de la glucosidase, procédé pour sa production et utilisations.**

⑤1 **Classification internationale (Int. Cl. 3). C 07 H 15/20; A 61 K 31/71; C 12 P 19/46
// C 12 R 1/465.**

②2 **Date de dépôt..... 18 septembre 1980.**

③③ ③② ③① **Priorité revendiquée : Japon, 19 septembre 1979, n° 11 9324/79.**

④1 **Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 13 du 27-3-1981.**

⑦1 **Déposant : Société de droit japonais dite : MEIJI SEIKA KAISHA LTD, résidant au Japon.**

⑦2 **Invention de : Shoji Omoto, Jiro Itoh, Tomizo Niwa, Takashi Shomura, Tetsutaro Niizato et
Shigeharu Inouye.**

⑦3 **Titulaire : *Idem* ⑦1**

⑦4 **Mandataire : Cabinet Germain & Maureau,
Le Britannia — Tour C,
20, bd Eugène-Deruelle, 69003 Lyon.**

La présente invention concerne un nouvel antibiotique, désigné sous le nom de substance SF-1130-x₃ utile comme agent d'inhibition de l'activité enzymatique de la glucosidase, ainsi qu'un procédé pour sa production fermentative par incubation d'une souche du genre *Streptomyces* suivie d'isolement de l'antibiotique obtenu du bouillon de fermentation. Elle concerne également différentes utilisations de cette substance SF-1130-x₃ comme inhibiteur de l' α -glucosidase et de la saccharose ainsi que comme médicament permettant la suppression d'une augmentation du taux de sucre sanguin chez les animaux vivants, y compris chez l'homme, qui ont absorbé de l'amidon et/ou des sucres.

Un certain nombre de substances utiles sont produites dans le bouillon de culture de différentes souches du genre *Streptomyces* et isolées de ce bouillon. On sait que la souche *Streptomyces myxogenes* SF-1130 (identifiée sous les références FERM-P 676 ou ATCC 31305) produit un antibiotique appelé substance SF-1130 (cf publication du brevet japonais n° 30393/73). Les inventeurs ont déjà découvert que d'autres substances antibiotiques actives contre les bactéries gram-négatives sont produites dans le bouillon de fermentation du microorganisme *Streptomyces myxogenes* SF-1130 et ils ont réussi à isoler ces substances actives et les ont désignées respectivement comme substance SF-1130-x₁ et substance SF-1130-x₂, comme divulgué dans la description de la prépublication de la demande de brevet japonais "Kokai" n° 26398/78 ou le brevet US 4 160 026.

Les inventeurs ont effectué d'autres recherches sur le produit brut contenant les substances SF-1130-x₁ et -x₂, obtenues à partir du bouillon de culture de *Streptomyces myxogenes* SF-1130, et ils ont découvert que ce produit brut contient, outre la substance SF-1130-x₁ et la substance SF-1130-x₂, un troisième ingrédient nouveau, non décelé jusqu'alors, mais qui présente une activité antibactérienne très faible.

Ils ont de plus décelé que la substance SF-1130-x₃

(ci-après appelée quelquefois le composé selon l'invention) est un oligosaccharide de nature faiblement basique ayant les propriétés physico-chimiques mentionnées ci-après, qui est une nouvelle substance distincte des espèces d'antibiotiques connues et voisines, et que le composé
5 selon l'invention est hautement actif pour supprimer l'activité enzymatique des glucosidases.

L'invention a donc tout d'abord pour objet un nouvel antibiotique, désigné sous le nom de substance SF-1130-x₃,
10 qui est utile comme agent d'inhibition de l'activité enzymatique des glucosidases et comme médicament permettant la suppression d'une augmentation du niveau de sucre sanguin chez les animaux et les hommes qui ont absorbé de l'amidon et/ou des sucres.

15 L'invention a également pour objet un procédé permettant la production de cette substance. Les autres objets de l'invention ressortiront bien de la description qui suit.

L'invention concerne donc la substance SF-1130-x₃,
20 nouvel antibiotique qui est un oligosaccharide de nature faiblement basique sous forme d'une poudre incolore, qui est soluble dans l'eau et le diméthylsulfoxyde, moins soluble dans le méthanol et l'éthanol et insoluble dans l'acétone, l'acétate d'éthyl, le chloroforme et le benzène et qui présente une réaction positive au nitrate d'argent-hydroxyde de sodium, au rouge de tétrazolium,
25 à l'anthrone et au réactif de Greig-Leaback ; cette substance étant en outre caractérisée par :

- a) un point de fusion de 183°C (avec décomposition)
30 et une rotation optique spécifique $[\alpha]_D^{23} = + 154^\circ$
(c 1, dans l'eau)
- b) une analyse élémentaire : C 43,31 %, H 5,88 %, N 1,71 % et O 49,10 % (solde)
- c) pas de pic caractéristique d'absorption dans le
35 spectre ultraviolet (dans l'eau contenant 100 µg/ml d'un échantillon pur de substance SF-1130-x₃).
- d) un spectre d'absorption infra-rouge, pastillé dans

le bromure de potassium correspondant à celui présenté en figure 1 du dessin annexé.

5 e) Un spectre d'absorption en résonance magnétique nucléaire proton dans l'oxyde de deutérium correspondant à celui présenté en figure 2 du dessin annexé.

10 f) Un spectre d'absorption en résonance magnétique nucléaire carbone dans l'oxyde de deutérium correspondant à celui présenté en figure 3 du dessin schématique annexé, et

15 g) Une tache unique à $R_{\text{raffinose}} = 0,64$ en chromatographie sur papier par la méthode descendante développée avec acétate d'éthyl-pyridine-eau (10:4:3 en volume) et à $R_{\text{raffinose}} = 0,62$ dans la même chromatographie sur papier par la méthode descendante développée avec n-butanol-pyridine-acide acétique-eau (6:4:1:3 en volume), quand les valeurs de $R_{\text{raffinose}}$ sont calculées en supposant que la raffinose donne une tache unique à $R_f = 1,00$ dans
20 la même chromatographie sur papier.

L'invention a également pour objet un procédé de production du nouvel antibiotique, la substance SF-1130-x₃ qui consiste à cultiver une souche du genre Streptomyces susceptible de produire la substance SF-1130-x₃ dans un
25 milieu de culture aqueux liquide contenant des sources de carbone et d'azote assimilables en conditions aérobies, pendant une période de temps suffisante pour produire et accumuler la substance SF-1130-x₃ dans la culture puis à récupérer ladite substance de la culture.

30 Dans le procédé selon l'invention, on peut utiliser toute souche du genre Streptomyces pour autant qu'elle produise en quantité substantielle la substance SF-1130-x₃. Comme exemple spécifique, on peut citer la souche SF-1130 qui a été isolée d'un échantillon de sol et a été désignée
35 comme souche Streptomyces myxogenes SF-1130 (Cf "The Research Annual Report of Meiji Confectionery Co" n° 14, pages 6-9 (1975) ou le brevet US N° 4 160 026). Cette

souche SF-1130 a été déposée à l'organisme japonais "Fermentation Research Institute" sous la référence FERM-p 676, ainsi qu'à l'American Type Culture Collection, Washington DC - USA sous la référence ATCC 31305.

5 Les propriétés physico-chimiques du nouveau composé selon l'invention sont indiquées ci-dessous :

- 1) Point de fusion : 183°C (avec décomposition)
- 2) Nature : oligosaccharide de nature faiblement basique
- 10 3) Poids moléculaire : environ 830 (estimé à partir d'analyse en spectrométrie de masse de son dérivé perméthylé)
- 4) Analyse élémentaire : C 43,31 % H 5,88 % N 1,71 % et O 49,10 % (solde)
- 15 5) Rotation optique spécifique : $[\alpha]_D^{23} = + 154^\circ$ (c 1, dans l'eau)
- 6) Spectre d'absorption dans l'ultra-violet : pas de pic d'absorption caractéristique (dans une solution aqueuse de 100 $\mu\text{g/ml}$ de substance SF-1130-x₃)
- 20 Spectre d'absorption infrarouge : présenté en figure 1 : pics à 3350 (large), 1647, 1400 (large), 1147 et 1033 (large) cm^{-1}
- 7) Spectre de résonance magnétique nucléaire proton : donné en figure 2
- 25 8) Spectre de résonance magnétique nucléaire carbone donné en figure 3
- 9) Solubilité : soluble dans l'eau et le diméthylsulfoxyde ; moins soluble dans un alcool tel que le méthanol et l'éthanol ; insoluble dans l'acétone, l'acétate d'éthyl, le chloroforme et le benzène.
- 30 10) Réaction colorée : positive au nitrate d'argent-hydroxyde de sodium, au rouge de tétrazolium, à l'anthrone et au réactif de Greig-Leaback.
- 35 11) Valeurs de R_{raffinose} en chromatographie sur papier : 0,64 en chromatographie sur papier par la

méthode descendante avec du papier filtre Toyo n° 50 développée avec acétate d'éthyl-pyridine-eau (10:4:3) et 0,62 dans la même chromatographie développée avec n-butanol-pyridine-acide acétique-eau (6:4:1:3) en admettant que le Rf de la raffinose soit 1,0 dans la même chromatographie sur papier

12) Hydrolysate acide contenant une quantité substantielle de D-glucose

Dans le dessin schématique annexé :

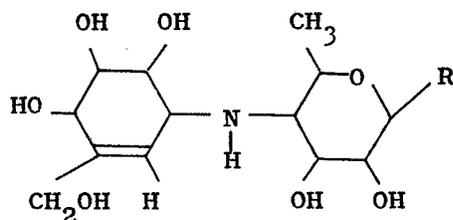
- la figure 1 représente une courbe du spectre d'absorption infrarouge d'un échantillon pur de la substance SF-1130-x₃ selon l'invention, pastillé dans du bromure de potassium

- la figure 2 représente une courbe du spectre d'absorption en résonance magnétique nucléaire proton d'un échantillon pur de la substance SF-1130-x₃, déterminé dans l'oxyde de deutérium à 100 MHz

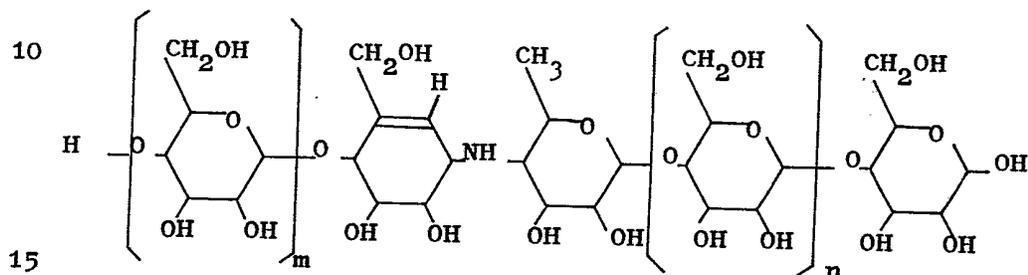
- la figure 3 représente une courbe de spectre d'absorption en résonance magnétique nucléaire carbone d'un échantillon pur de la substance SF-1130-x₃ déterminé dans l'oxyde de deutérium à 100 MHz.

En vue des propriétés physico-chimiques décrites ci-avant, le composé selon l'invention est comparé à des substances analogues connues : un résumé des résultats de cette comparaison est donné ci-après :

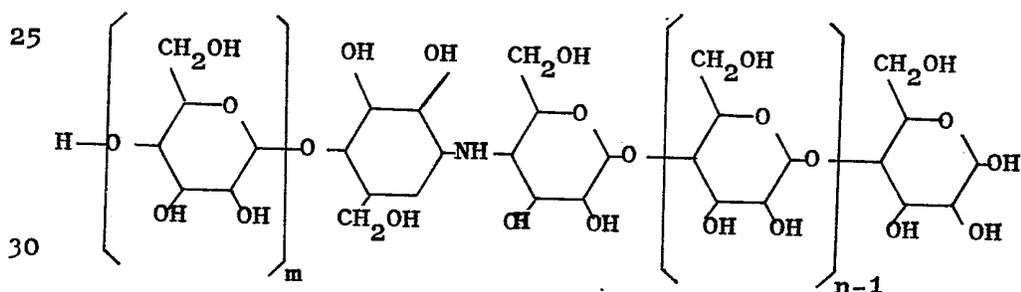
(1) La Prépublication de demande de brevet japonais "Kokai" n° 53593/75 (correspondant à demande de brevet allemand DT-OS P 23 47 782) décrit un amino-sucré de formule générale :



dans laquelle R est un oligosaccharide contenant de 1 à 7 unités d'un monosaccharide, qui est un inhibiteur de l'amylase. La prépublication de demande de brevet japonais "Kokai" n° 122342/77 (correspondant à la demande de brevet allemand DT-OS P 26 14 393) et la revue "Naturwissenschaften" 64, 535, (1977) décrit un amino-sucré de formule générale :



dans laquelle m est un nombre entier de 1 à 8 et n est zéro ou un nombre entier de 1 à 8, mais m + n = un nombre entier de 3 à 8, qui est un inhibiteur d'un glucosidohydrase. En outre, la prépublication de demande de brevet japonais "Kokai" n° 92909/79 décrit un amino-sucré de formule générale :



dans laquelle m est zéro ou un nombre entier de 1 à 8 et n est un nombre entier de 1 à 8 mais m + n = un nombre entier de 1 à 8, qui est un inhibiteur de l' α -amylase, du saccharase, du maltase et similaire. Tous ces amino-sucrés contiennent le proton vinyl qui présente un pic à δ 5,8 - 6,0 dans leur spectre d'absorption en résonance

magnétique nucléaire proton. Le nouveau composé selon l'invention ne présente pas ce pic à δ 5,8 - 6,0 dans son spectre d'absorption en résonance magnétique nucléaire proton ; sa molécule ne contient donc pas le proton vinyl.

5 (2) La prépublication de demande de brevet japonais "Kokai" n° 54990/76 et la publication de brevet japonais n° 24119/77 décrivent un inhibiteur de glucoamylase produit par un microorganisme *Streptomyces* sp. N° 33 (déposé sous le n° FERM-P 2788) (identifié comme souche de Strepto-
10 myces atroolivaceus) et qui est une substance acide ne présentant pas d'activité optique. Contrairement à cet inhibiteur de glucoamylase, le composé selon l'invention est une substance faiblement basique présentant une ac-
tivité optique.

15 (3) Les publications de brevets japonais n° 21596/77 et 21597/77 décrivent un inhibiteur d'amylase désigné sous le nom d'"amylostatine A", produit par un microorganisme Streptomyces var. amylostaticus (déposé sous le n° FERM-P N° 2499) et que l'on estime être un polysaccharide neutre
20 d'un poids moléculaire d'environ 2000. Le nouveau composé se distingue à cet égard de l'amylostatine A et, de plus, présente en chromatographie sur papier, une valeur de Rf différente de celle de l'amylostatine.

(4) La revue "J. Jap. Soc. Starch Sci." 26, n° 2,
25 pp 134-144 (1979) décrit d'autres inhibiteurs de l'amylase TAI-A et -B de Streptomyces calvus TM-521 qui ne montrent pas le signal du groupe méthyl à δ environ 1,35 dans le spectre d'absorption en résonance magnétique nu-
cléaire proton ; à cet égard ces inhibiteurs d'amylase
30 différent du composé selon l'invention qui montre le signal du groupe méthyl à δ environ 1,35 dans le spectre d'absorption en résonance magnétique nucléaire proton.

(5) La prépublication de demande de brevet japonais "Kokai" n° 26398/78 de la demanderesse ou le brevet US
35 correspondant n° 4 160 026 revendique les substances SF-1130-x₁ et SF-1130-x₂ qui présentent, en commun avec le composé selon l'invention, le fait qu'elles sont des

farine de soja, le germe de blé ; la levure séchée, la peptone, l'extrait de viande, la liqueur de macération de maïs, le sulfate d'ammonium et le nitrate de sodium comme sources d'azote. On peut y ajouter, si nécessaire, 5 des sels minéraux tels que le carbonate de calcium, le chlorure de sodium, le chlorure de potassium, les phosphates ou similaires. On peut de plus incorporer dans le milieu de culture certaines matières organiques et minérales aidant à la croissance de la souche utilisée 10 et promouvant la production de la substance selon l'invention.

On préfère en général la méthode de culture en milieu liquide, particulièrement en conditions aérobies submergées, comme généralement appliquée à la production 15 d'antibiotiques connus. Dans le procédé industriel, la culture est avantageusement effectuée à 25-38°C, spécialement aux environs de 28°C en conditions aérobies submergées en utilisant un milieu de culture adapté qui a été inoculé à une suspension de spores de la souche 20 SF-1130 ou à une culture de germes de ladite souche qui a été cultivée pendant 2 à 3 jours. On peut utiliser, dans le procédé selon l'invention, le milieu et les conditions de culture décrits dans le brevet US 4 160 026 de la demanderesse.

25 Pour récupérer le produit brut contenant le composé selon l'invention à partir du bouillon de fermentation de la souche SF-1130, on peut également appliquer les conditions d'isolement et de concentration utilisées dans la récupération des substances SF-1130-x₁ et SF-1130-x₂ 30 décrites dans le brevet US 4 160 026 puisque le composé selon l'invention est de nature très similaire aux substances SF-1130-x₁ et SF-1130-x₂.

Le bouillon de fermentation contenant la substance SF-1130-x₃ est filtré en milieu neutre pour éliminer le 35 mycelium et les matières insolubles, puis le filtrat du bouillon, à pH neutre, est traité avec du charbon actif pour adsorption des substances actives. Le carbone est

alors extrait avec de l'acétone-eau 50 à 60 % pour désorber la substance SF-1130-x₃ du charbon actif. L'extrait est concentré à siccité, le résidu est dissous dans l'eau et la solution aqueuse, à un pH faiblement acide, est sou-

5 mise à une chromatographie sur résine échangeuse d'ions fortement acide telle que le Dowex 50Wx2 (forme H+), puis on lave à l'eau et on élue avec une solution aqueuse 0,1 N d'ammoniaque. L'éluat est rassemblé en fractions et les fractions antibactériellement actives sont combi-

10 nées et concentrées à siccité pour donner un produit brut contenant le composé selon l'invention sous forme d'une poudre incolore.

Pour séparer le composé selon l'invention des substances SF-1130-x₁ et SF-1130-x₂, ce produit brut est re-

15 pris dans l'eau et réglé à pH 2 par HCl 0,1 N et la solution aqueuse résultante est soumise à une chromatographie sur résine échangeuse de cations fortement acide telle que le Dowex 50Wx2 (forme sel de pyridinium) développée avec un tampon pyridine 0,1 M-acide formique (pH 3,1)

20 comme solvant de développement. Les substances SF-1130-x₁ et SF-1130-x₂ sont tout d'abord éliminées par élution de la colonne de résine. Une élution ultérieure avec le solvant de développement ci-dessus permet d'obtenir la substance SF-1130-x₃ ; cet éluat est rassemblé en frac-

25 tions et celles qui ne contiennent que la substance SF-1130-x₃ sont combinées et concentrées à siccité pour donner le composé selon l'invention sous forme de poudre incolore. En tirant avantage du fait que le poids molé-

30 culaire du composé selon l'invention est inférieur à ceux des substances SF-1130-x₁ et SF-1130-x₂, on peut également séparer le composé selon l'invention de ces substances en utilisant une technique classique d'isole-

35 ment telle qu'un processus de filtration sur gel par exemple à l'aide de Biogel p-2, Sephadex G-10 (Pharmacia C°, Suède) et similaires comme agent de filtration sur gel.

Le composé selon l'invention est utile pour inhiber

à un haut degré la réaction enzymatique des glucosidases et tout spécialement de l' α -glucosidase aussi bien que de la saccharase. On peut estimer cette action inhibitoire selon le processus ci-après, à l'aide d' α -glucosidase préparée à partir d'ileum mucosa de porc selon "Acta Chem. Scand." vol 12, page 1997 (1958).

(1) Détermination de l'activité d'inhibition de l' α -glucosidase. On prépare les quatre solutions suivantes :

10 Solution A : solution d'enzyme (α -glucosidase) convenablement diluée à la concentration désirée avec une solution tampon de maléate 0,1 M.

Solution B : solution tampon de maléate 0,1 M (pH 6,6)

15 Solution C : solution aqueuse 0,014 M de p-nitrophényl- α -glucoside (en tant que substrat) dans l'eau

Solution D : solution aqueuse 0,1 M de carbonate de sodium.

20 On place 0,5 ml d'une solution obtenue par dissolution dans la solution B d'un échantillon de l'inhibiteur d'enzyme à examiner, à la concentration appropriée, en même temps que 0,25 ml de solution C dans un tube à essai et on immerge ce tube à essais pendant 5 minutes à 37°C dans un bain-marie maintenu à cette température. La solution mélangée dudit tube à essais est ensuite mélangée à 25 0,25 ml de solution A pour démarrer la réaction enzymatique. 20 minutes après le début de réaction, on ajoute 5 ml de solution D à la solution réactionnelle pour arrêter la réaction enzymatique. On mesure l'absorbance de la solution 30 réactionnelle résultante à 400 nm ; la valeur trouvée est T. On répète l'opération ci-dessus (test témoin) sans utiliser l'inhibiteur d'enzyme, puis on mesure comme ci-dessus l'absorbance à 400 nm de la solution réactionnelle de contrôle obtenue à partir de ce test-témoin utilisant la solution 35 B, c'est-à-dire de la solution tampon 0,1 M de maléate ne contenant pas d'inhibiteur d'enzyme ; la valeur trouvée est C.

Dans l'essai ci-dessus, on calcule le degré (%) d'inhibition de l'échantillon d'inhibiteur vis-à-vis de l' α -glucosidase selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{C-T}{C} \times 100$$

5

(2) Détermination de l'activité d'inhibition de la saccharase.

On prépare les trois solutions suivantes :

10

Solution A : solution de saccharase diluée à la concentration en enzyme appropriée avec une solution tampon de maléate 0,1 M (pH 6,0)

Solution B : solution tampon 0,1 M de maléate (pH 6,0)

15

Solution C : solution aqueuse de sucrose à 4 % (comme substrat) dans l'eau

20

On place dans un tube à essais, en même temps que 0,5 ml de solution C, 1 ml d'une solution obtenue par dissolution à la concentration appropriée dans la solution B d'un échantillon de l'inhibiteur d'enzyme à examiner et on immerge ce tube à essais pendant 5 minutes dans un bain-marie porté à 30°C. La solution résultante est ensuite mélangée à 0,5 ml de solution A pour amorcer la réaction enzymatique. 10 minutes après le début de la réaction, on prélève une partie (30 μ l) de la solution réactionnelle et

25

on détermine le pouvoir réducteur de cette solution colorimétriquement selon la méthode de Somogy Nelson. La valeur d'absorbance à 660 nm trouvée est appelée T.

30

On répète l'opération ci-dessus en l'absence d'inhibiteur d'enzyme et on en mesure l'adsorbance à 660 nm ; la valeur trouvée pour cet échantillon de contrôle est appelée C.

35

Dans la méthode d'essai ci-dessus, on calcule le degré d'inhibition de l'échantillon à la saccharase selon l'équation

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{C-T}{C} \times 100$$

Dans l'essai ci-dessus, la substance SF-1130-x₃ selon l'invention montre une activité telle que son ID₅₀

(c'est-à-dire la dose donnant 50 % d'inhibition) vis-à-vis de l' α -glucosidase est de $2,24 \times 10^{-5}M$ et son ID_{50} vis-à-vis de la saccharase est de $2,0 \times 10^{-5}M$. Dans un but de comparaison on a mesuré, de la même façon que ci-dessus, l'activité d'inhibition des substances SF-1130- x_1 et SF-1130- x_2 , ainsi que de la nojirimycine (connu comme inhibiteur d'amylase). Les valeurs trouvées sont respectivement de $1,5 \times 10^{-4}M$ pour la substance SF-1130- x_1 , $1,8 \times 10^{-4}M$ pour la substance SF-1130- x_2 et $3,6 \times 10^{-4}M$ pour la nojirimycine.

Il convient de plus de noter que l'on applique le composé selon l'invention par voie orale aux animaux vivants dans un but de suppression de l'augmentation du taux de sucre sanguin chez les animaux ayant absorbé, par voie orale, de l'amidon et des sucres. Le test est effectué de la façon suivante : les animaux sont des souris mâles souche IRC (six souris par groupe, pesant en moyenne 25g) que l'on a privés d'eau pendant 20 heures. On a administré à ces souris, par voie orale, 1g/kg d'amidon ou 2,5 g/kg de sucrose. On leur a administré simultanément par voie orale 10 mg/kg du composé selon l'invention ou 10 mg/kg de désoxynojirimycine. 30 minutes après l'administration on mesure le taux de glucose dans le sang. Les résultats de l'essai sont rassemblés dans la table ci-après.

Produit à essayer	Taux de sucre sanguin (mg/dl)	
	Groupes recevant l'amidon	Groupes recevant le sucrose
Non traité	153 \pm 24,2	189 \pm 41,5
Composé selon l'invention	88 \pm 20,7	96 \pm 10,2
SF-1130- x_1 + - x_2 (2:3)	124 \pm 17,8	100 \pm 20,7
Désoxynojirimycine (comparaison)	101 \pm 22,9	93 \pm 15,4
Contrôle (n'ayant reçu ni amidon ni sucrose, ni produit à essayer)	75 \pm 11,0	66 \pm 13,0

On estime l'activité antibactérienne de la substance SF-1130-x₃ selon l'invention pour l'inhibition de la croissance de différentes bactéries par une méthode classique de plaque avec disque de papier. On dissout la substance SF-1130-x₃ dans l'eau distillée à une concentration de 1mg/ml. On imprègne avec la solution ainsi préparée un disque de papier-filtre que l'on sèche ensuite à l'air. On a trouvé que le composé selon l'invention, à une dose de 1 mg/ml, donne les zones d'inhibition de 13,3 mm de diamètre vis-à-vis du microorganisme d'essai, Escherichia coli K 12 R.

Afin d'estimer la toxicité aigüe de la substance SF-1130-x₃ selon l'invention, on a administré ce composé par voie orale à cinq souris ; toutes les souris ont toléré des doses de 500 mg/kg de substance SF-1130-x₃. Il résulte de ce test que le composé selon l'invention a une très faible toxicité.

Comme il ressort de ce qui précède, le composé selon l'invention présente une activité d'inhibition des glucosidases non seulement in vitro mais aussi in-vivo.

L'invention a donc également pour objet un inhibiteur des glucosidases qui contient, comme ingrédient actif, la substance SF-1130-x₃, éventuellement associée à un support ou à un diluent pharmaceutiquement acceptable.

L'inhibiteur des glucosidases selon l'invention est utile pour le contrôle du métabolisme des hydrates de carbone chez les animaux vivants, y compris chez l'homme, par exemple dans le traitement thérapeutique du diabète, de l'obésité, des gastrites, de l'ulcère gastrique, de l'ulcère du duodénum, de la constipation et autres, ainsi que pour le traitement de maladies secondaires attribuables au métabolisme anormal des hydrates de carbone comme mentionné ci-dessus. L'inhibiteur des glucosidases selon l'invention est également utile pour la prévention des caries dentaires. Les hydrates de carbone et spécialement le sucrose, sont dégradés par les glucosidases de certains microorganismes existant dans la bouche et les

produits de dégradation tels que le glucose, activent la formation de caries dentaires. On peut supprimer la dégradation des hydrates de carbone à la surface des dents en mettant dans la bouche l'inhibiteur de glucosidases selon l'invention.

L'inhibiteur de glucosidases selon l'invention peut être formulé sous forme de préparation solide ou liquide contenant la substance SF-1130-x₃ en tant qu'ingrédient actif associée avec un support ou un diluant solide ou liquide. La préparation solide peut être utilisée sous forme de tablettes, dragées, capsules ou suppositoires et la préparation liquide sous forme de gel, crème, suspension, émulsion, sirop ou solution isotonique. La préparation peut contenir en outre des charges, diluants, liants, lubrifiants ou similaires. Quand l'inhibiteur selon l'invention est formulé en suppositoires, on utilise une base telle que le beurre de cacao ou similaire. La préparation liquide peut contenir un agent tensio-actif pharmaceutiquement acceptable, un conservateur, des parfums, des adoucissants et similaires en plus du diluant conventionnel tel que l'eau, l'alcool éthylique, le propylène-glycol, une huile animale ou végétale ou similaire.

La posologie de la substance SF-1130-x₃ selon l'invention varie selon la méthode d'administration employée, la nature de la maladie, l'état du malade etc... En général pourtant la substance SF-1130-x₃ selon l'invention peut être administrée par voie orale à une dose allant de 100 mg/kg à 1g/kg et par jour. Quand la substance SF-1130-x₃ est administrée par voie parentérale, les doses peuvent aller de 1/2 à 1/5 de 100 à 100 mg/kg.

La substance SF-1130-x₃ selon l'invention peut être utilisée non seulement dans les applications thérapeutiques ci-dessus mais aussi dans un but prophylactique. Dans ce but prophylactique, la substance SF-1130-x₃ est incorporée dans des aliments ou des boissons contenant des hydrates de carbone avec beaucoup de calories comme par exemple le chocolat, le pain, la confiture ou les bois-

sons non-alcoolisées tels que les jus de fruits afin de prévenir les gains de poids chez l'homme absorbant ces nourritures ou boissons. De plus, l'inhibiteur selon l'invention peut être efficacement mélangé à du chewing-gum et à de la pâte dentifrice pour le traitement prophylactique des caries dentaires

La substance SF-1130-x₃ peut en outre être incorporée à une base d'alimentation pour les animaux domestiques pour la suppression de la conversion métabolique des hydrates de carbone en graisses se produisant dans le corps de l'animal permettant ainsi d'accroître la teneur en viande à faible teneur en graisses dans le corps de l'animal. La substance SF-1130-x₃ selon l'invention peut être ajoutée à la nourriture selon des doses allant de 10 à 100 mg/kg de nourriture.

La substance SF-1130-x₃ selon l'invention est également utile comme inhibiteur d'amylase fréquemment utilisé en analyse biochimique pour l'examen médical ou pour des recherches de laboratoire.

On sait que, quand les hydrates de carbone tels que l'amidon et les sucres sont absorbés par les animaux vivants, y compris les hommes, ils sont transformés en glucose sous l'action de la glucosidase dans le tube digestif des animaux, puis absorbés dans le sang. Quand une quantité excessive de glucose est absorbée dans le sang des animaux vivants, il amène un gain de poids trop élevé, ce qui peut conduire à des résultats nuisibles pour la santé. Quand un patient souffrant de diabète a pris trop d'hydrates de carbone, le niveau de glucose dans le sang peut s'élever de façon anormale et amener des effets non désirables sur l'état du patient. Il est donc utile de supprimer la conversion métabolique des hydrates de carbone en glucose par la glucosidase dans le tube digestif de l'homme. La méthode permettant de supprimer l'activité enzymatique de la glucosidase dans le tube digestif des animaux vivants, hommes compris, consiste donc à administrer par voie orale une quantité efficace de la subs-

tance SF-1130-x₃ selon l'invention.

La présente invention sera maintenant illustrée à l'aide des exemples suivants non limitatifs.

Exemple 1

5 Une culture de germes de la souche de Streptomyces myxogenes SF-1130 (identifiée sous les références FERM-P 676 ou ATCC 31305) est inoculée à 200 l d'un milieu de culture liquide contenant 5 % de sirop d'amidon, 2,5 % de farine de soja, 1,0 % de germe de blé et 0,15 % de chlorure de sodium. Le milieu inoculé est incubé dans une
10 cuve de fermentation sous aération et agitation à 28°C pendant 64 heures.

A la fin de l'incubation, on règle le pH de 50 l du bouillon de culture obtenu à 2,0 par addition d'acide
15 nitrique 5N, on le mélange à 50 g de charbon actif et à 2 kg d'un adjuvant de filtration, on agite le mélange pendant 15 minutes et on filtre. Le filtrat obtenu est neutralisé à l'hydroxyde d'ammonium et mélangé avec 1 kg de charbon actif pour adsorption de la surface active
20 puis on agite pendant 30 minutes. Le mélange est ensuite filtré et le charbon actif éliminé est lavé avec trois fois 10 l d'eau distillée. On extrait ensuite le charbon actif pendant 15 minutes avec 4 l d'une solution aqueuse à 60 % d'acétone à pH 2,5 sous agitation pour désorber
25 la substance active du charbon actif. Ce processus d'extraction est répété deux fois et les extraits obtenus sont rassemblés et concentrés à faible volume. La solution concentrée est ajoutée goutte à goutte à 5 l d'acétone pour laisser déposer 90 g d'un précipité incolore.

30 Le précipité incolore est rassemblé par filtration et repris dans 250 ml d'eau distillée ; on fait passer la solution résultante à travers une colonne (4x40cm) d'une résine échangeuse de cations fortement acide, l'Amberlite IR-120 (forme H⁺) (Rohm & Haas C°) pour adsorption de la
35 substance active. Après lavage soigneux à l'eau distillée on élue la colonne de résine avec de l'hydroxyde d'ammonium à 2 %. L'éluat est rassemblé en fractions de 20 ml

et les fractions actives vis-à-vis du E-Coli K 12 R sont combinées et concentrées à siccité sous pression réduite pour donner 5,0 g d'une poudre brune.

Cette poudre (5,0 g) est alors reprise dans 50 ml
5 d'eau distillée et on fait passer la solution obtenue à travers une colonne (3 x 70 cm) de Dowex 50W x 2 (forme pyridinium passage en microns 75 à 38 μm) (Dow Chemical C°, U.S.A.) pour adsorption de la surface active. La colonne de résine est alors éluée avec une solution tampon pyridine
10 0,1 M - acide formique (pH 3,1). L'éluat est rassemblé en fractions de 10 ml et on obtient les fractions actives n° 101 à 120 contenant la substance SF-1130-x₁ et les fractions actives n° 130 à 170 contenant la substance SF-1130-x₂. La colonne de résine est ensuite éluée avec
15 la même solution tampon que ci-avant pour donner les fractions actives n° 180-224 qui ne contiennent que la substance SF-1130-x₃ selon l'invention qui donne une tache unique (colorée par le réactif nitrate d'argent-hydroxyde de sodium) à une valeur de $R_{\text{raffinose}} = 0,64$ en chromatographie sur papier par la méthode descendante développée
20 avec le solvant acétate d'éthyl-pyridine-eau (10:4:3). Les fractions actives n° 180-224 qui montrent la valeur de $R_{\text{raffinose}}$ indiquée ci-dessus sont combinées et concentrées à siccité pour donner environ 800 mg d'une poudre incolore.

25 Cette poudre incolore est dissoute dans 2 ml d'eau distillée et on fait passer la solution aqueuse obtenue à travers une colonne de 100 ml d'un agent de filtration sur gel Biogel p-2 (produit par Bio Rado C°) développée à l'eau. L'éluat est rassemblé en fractions de 8 ml et
30 les fractions antibactériellement actives n° 35-43 sont combinées et concentrées à siccité pour donner environ 400 mg de substance SF-1130-x₃ pure sous forme de poudre incolore. Pt f. 183°C (déc.). $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = + 154^{\circ}$ (c 1, eau).

35 Les exemples 2 et 3 suivants illustrent la préparation de chocolat ou de boisson dans lesquels la substance SF-1130-x₃ est incorporée comme inhibiteur de glucosidase.

Exemple 2

Les ingrédients mentionnés ci-après sont formulés en chocolat par mélange dans un mélangeur dans les proportions suivantes :

	<u>Ingrédients</u>	<u>% en poids</u>
5	Substance SF-1130-x ₃	0,1
	Amer de chocolat	15,85
	Oléo-beurre	5,0
	Sucre	44,0
10	Vanilline	0,05
	Lécithine	0,6
	Lait de cacao	23,0
	Beurre de cacao	<u>11,4</u>
	Total	100,00

15 Exemple 3

Les ingrédients ci-après sont formulés en boisson par mélange dans un mélangeur dans les proportions suivantes :

	<u>Ingrédients</u>	<u>% en poids</u>
20	Substance SF-1130-x ₃	0,05
	Sucre isomérisé	13,5
	Acide citrique	0,17
	Citrate de sodium	0,016
	Parfum de citron	0,1
25	Eau	<u>81,164</u>
	Total	100,00

- REVENDEICATIONS -

- 1 - Nouvel antibiotique, caractérisé en ce qu'il est un oligosaccharide de nature faiblement basique sous forme d'une poudre incolore, soluble dans l'eau et le diméthylsulfoxyde, moins soluble dans le méthanol et l'éthanol et insoluble dans l'acétone, l'acétate d'éthyl, le chloroforme et le benzène et qui présente une réaction positive au nitrate d'argent-hydroxyde de sodium, au rouge de tétrazolium, à l'anthrone et au réactif de Greig-Leaback, cet antibiotique étant en outre caractérisé par
- 5
- 10
- a) un point de fusion de 183°C (avec décomposition) et une rotation optique spécifique $[\alpha]_D^{23} = + 154^\circ$ (c 1, dans l'eau)
- 15
- b) une analyse élémentaire : C 43,31 %, H 5,88 %, N 1,71 % et O 49,10 % (solde)
- c) pas de pic caractéristique d'absorption dans le spectre ultraviolet (dans l'eau contenant 100 µg/ml d'un échantillon pur de substance SF-1130-x).
- 20
- d) un spectre d'absorption infra-rouge, pastillé dans le bromure de potassium correspondant à celui présenté en figure 1 du dessin annexé
- d) un spectre d'absorption en résonance magnétique nucléaire proton dans l'oxyde de deutérium correspondant à celui présenté en figure 2 du dessin annexé
- 25
- f) un spectre d'absorption en résonance magnétique nucléaire carbone dans l'oxyde de deutérium correspondant à celui présenté en figure 3 du dessin schématique annexé, et
- 30
- g) une tache unique à $R_{\text{raffinose}} = 0,64$ en chromatographie sur papier par la méthode descendante développée avec acétate d'éthyl-pyridine-eau (10:4:3 en volume) et à $R_{\text{raffinose}} = 0,62$ dans la même chromatographie sur papier par la méthode descendante développée avec n-butanol-pyridine-acide acétique -eau (6:4:1:3 en volume), quand les valeurs de $R_{\text{raffinose}}$ sont calculées en sup-
- 35

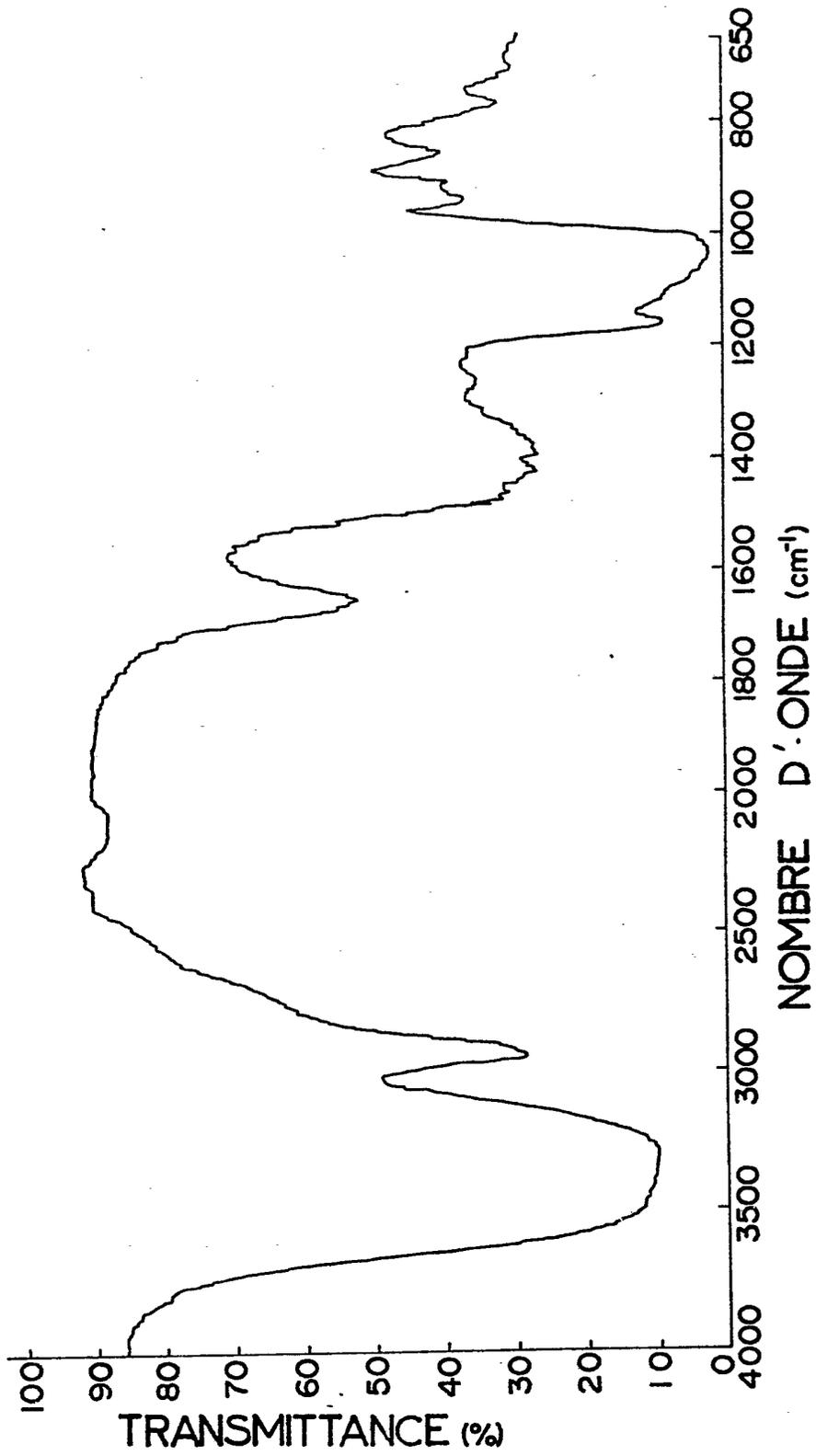
posant que la raffinose donne une tache unique à Rf = 1,00 dans la même chromatographie sur papier.

2- Procédé de production du nouvel antibiotique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à
5 cultiver une souche du genre *Streptomyces* susceptible de produire ledit antibiotique dans un milieu de culture aqueux liquide contenant des sources de carbone et d'azote assimilables, en conditions aérobies, pendant une période de temps suffisante pour produire et accumuler l'anti-
10 biotique SF-1130-x₃ dans la culture, puis à récupérer l'antibiotique de la culture.

3 - Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'antibiotique est produit par culture du microorga-
nisme *Streptomyces myxogenes* SF-1130 déposé sous les référé-
15 rences FERM-P 676 et ATCC 31305 dans un milieu de culture liquide en conditions aérobies.

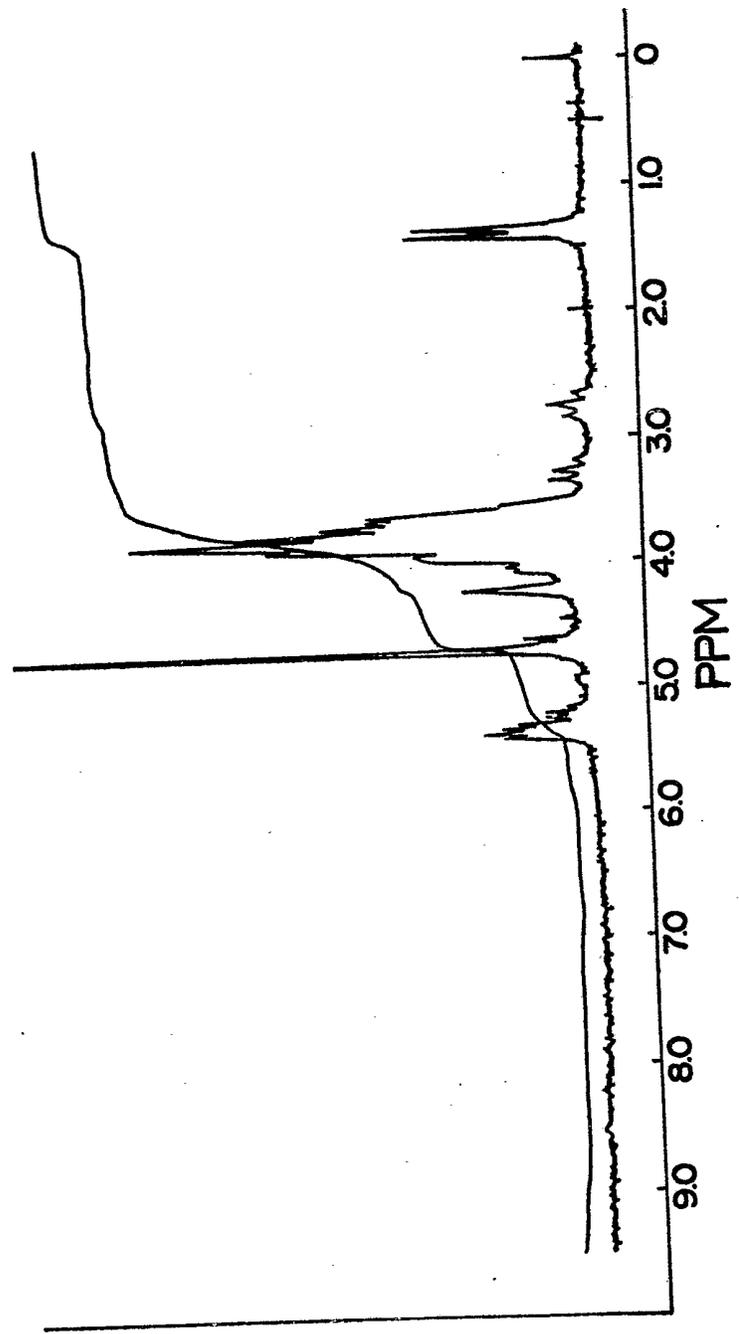
4 - Inhibiteur de la glucosidase, caractérisé en ce qu'il comporte comme ingrédient actif l'antibiotique selon la revendication 1, éventuellement combiné à un sup-
20 port pharmaceutiquement acceptable.

FIG. 1



2465742

FIG. 2



2465742

FIG. 3

