

376787

PATENTE DE INVENCION

Cas 3-0/2130

SECCION TECNICA
CLASIFICACION
CLAS. C-12
SUBCLAS. D

376787



Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE PRODUCTOS ENZIMATICOS PROTEOLITICOS.

=====

Solicitante: INSTITUTO DE FARMACOLOGIA ESPAÑOLA, entidad española, residente en Alcalá 95 . Madrid-9.

=====

La presente invención se refiere a nuevos productos enzimáticos proteolíticos que tienen la propiedad fundamental de poder provocar in vivo una mejora de la viscosidad de los mucus, especialmente del mucus intestinal, del mucus bronquial y del mucus cervical. La invención se refiere igualmente a la preparación y a las aplicaciones alimenticias, veterinarias, dietéticas y farmacéuticas.



376787

5. El desarrollo constante del aumento intensivo de los animales en los países industrializados, y la severa escasez en proteínas animales en los países en vía de desarrollo, hacen cada vez más necesarios estudios referidos al aumento de la velocidad de crecimiento en los animales y a la disminución de su índice de consumo.

10. Se ha estudiado ya recientemente la influencia de una adición en los alimentos compuestos para los animales de diferentes enzimas ordinarias (proteolíticas, lipolíticas, amilolíticas) susceptibles de facilitar la digestión de los principales constituyentes de estos alimentos (prótidos, lípidos, glúcidos). Se podía suponer en efecto que estas enzimas exógenas, que vienen en complemento de las enzimas endógenas, facilitarían la digestión in vivo y por consiguiente el crecimiento de los animales.

15. Todos estos estudios no han conducido hasta el momento a resultados prácticamente admisibles: la ligera mejora e inconstancia de la velocidad de crecimiento y el índice de consumo que ha sido observado alguna vez, ha aparecido finalmente muy débil en consideración con el precio de las enzimas añadidas.

20.

25. Por el contrario, la invención señala unas enzimas que se distinguen de las enzimas ordinarias por su aptitud a mejorar la viscosidad del mucus intestinal, y por lo tanto, a aumentar la velocidad de absorción de los



15-072



376787

alimentos digeridos, como por otra parte aquella de los medicamentos tomados por vía oral.

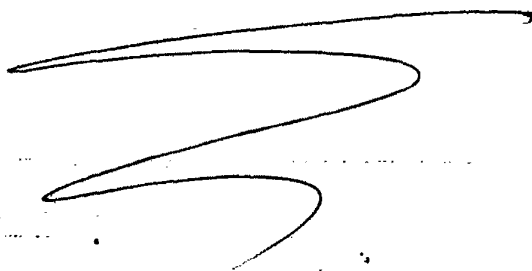
5. La mucosa intestinal, frágil como todas las mucosas, está protegida contra las agresiones del medio exterior por una capa de líquido viscoso: el mucus intestinal. La viscosidad de este mucus está relacionada con la presencia de macromoléculas de mucinas y de mucopolisacáridas que, unidas entre ellas por puentes de proteínas, forman una estructura reticular apretada.

10. El mucus intestinal constituye de esta forma una especie de barrera protectora entre la mucosa y el bolo alimenticio en el curso de la digestión. Esta barrera evita a la pared intestinal un contacto demasiado estrecho con las gruesas moléculas de enzimas endógenas (tripsina, quimotripsina) que provocan la digestión de los alimentos, pero podrían terminar por atacar la mucosa misma. Por el contrario, esta barrera tiene que dejar filtrar rápidamente las pequeñas moléculas de alimentos digeridos que deben traspasar esta pared intestinal para unirse a la corriente sanguínea. Si es excesivamente viscoso, el mucus intestinal corre el riesgo de frenar el paso en la sangre de los alimentos digeridos; si lo es insuficientemente, corre el riesgo de perder su papel protector normal frente de la mucosa. Se concibe entonces que estos dos estados opuestos, un óptimo de viscosidad se establece

15.

20.

25.



376787



raramente.

Por lo tanto, la invención está precisamente basada en las dos sorprendentes comprobaciones que siguen:

5. A - Es posible fabricar industrialmente por fermentación enzimas proteolíticas capaces de conferir in vivo al mucus intestinal el máximo de viscosidad en cuestión. Dadas por vía oral, es decir, prácticamente añadidas en los alimentos y/o en el agua de la bebida, estas enzimas
10. provocan una reducción determinada y reversible de la viscosidad del mucus intestinal, y por consiguiente un aumento selectivo de la velocidad de absorción para los alimentos digeridos, como por otra parte para los medicamentos que serían dados por vía oral, al mismo tiempo que estas
15. enzimas o inmediatamente después de ellas.

- Las enzimas proteolíticas ordinarias, que han sido ya ensayadas sin éxito en alimentación animal, tienen por el contrario sobre la viscosidad del mucus intestinal una acción bien insuficiente o bien excesiva. En el
20. primer caso, la velocidad de absorción a través de la pared intestinal queda sin cambio. En el segundo caso, la acción excesiva de la enzima, como también cualquier otra acción irritante, provoca una brusca descarga en el intestino del contenido de las glándulas de mucus, con reforma
25. acelerada del contenido de estas glándulas; esta indeseable

376787



hipersecreción reaccional de mucus, que aparece notablemente por un simple examen visual de la pared intestinal de los animales a los que se ha hecho la autopsia, es comparable a la indeseable hipersecreción reaccional de sebo provocada por un champú demasiado detergente.

5.

La existencia de enzimas proteolíticas capaces de mejorar la viscosidad del mucus intestinal, es decir, capaces de reducir notablemente esta viscosidad sin peligro de hipersecreción reaccional, no era evidente a priori.

10.

B - De esta mejora de la viscosidad del mucus, y por consiguiente, de este aumento de la velocidad de absorción para los alimentos digeridos, resultaría un aumento de la velocidad de crecimiento de los animales y una disminución de su índice de consumo.

15.

Esta última consecuencia no era evidente.

20.

En efecto, dada la longitud del tránsito intestinal, los alimentos terminan siempre por ser completamente absorbidos, y la experiencia muestra que no queda normalmente en los excrementos que residuos sin valor alimenticio apreciable. Sin embargo, esta absorción completa no es un criterio suficiente de utilización óptima de los alimentos. Sin duda se podía suponer que era conveniente que la sangre contenga simultáneamente y en concentración suficiente todos los factores de la síntesis anabólica. Pero solo la experiencia podía confirmar la ley siguiente, no

25.



376787



5. evidente a priori: para acelerar al máximo la velocidad de crecimiento, es preferible obtener una concentración sanguínea máxima de los alimentos digeridos durante un tiempo relativamente corto, antes que una concentración media durante un tiempo más largo, incluso si en los dos casos la cantidad total de alimentos pasados en la sangre es finalmente la misma.

10. Los productos enzimáticos según la invención, capaces de provocar in vivo una mejora adecuada del mucus están caracterizados de una parte por comparación de su acción in vitro sobre el mucus intestinal con las de dos enzimas proteolíticas de acción mejorante natural: la tripsina y la quimotripsina, dicha comparación siendo efectuada según la prueba de la reducción determinada de la viscosidad (en abreviatura prueba RMV) y, por otra parte su intensidad frente a los inhibidores tripsicos, esta última condición asegurando una acción in vivo.

15. Mas precisamente la reducción de la viscosidad del mucus intestinal por los mencionados productos enzimáticos debe estar comprendida en $\pm 5\%$ aproximadamente con relación a la viscosidad del mencionado mucus no tratado, entre los valores de la reducción de viscosidad debidos a la tripsina y a la quimotripsina, es decir, respectivamente entre $60 \pm 5 = 65\%$ y $40 - 5 = 35\%$ con relación a la viscosidad del mencionado mucus no tratado, en las condi-

376787



ciones definidas más adelante.

5. Según una característica de la invención, la reducción in vitro de la viscosidad del mucus intestinal debida a los mencionados productos enzimáticos está exactamente comprendida entre las debidas a la tripsina y a la quimotripsina (60 - 40 %).

10. El procedimiento según la invención, por fermentación de microorganismos productores de enzimas proteolíticas está igualmente basada sobre la prueba RMV, estando parada la fermentación desde que las sustancias enzimáticas elaboradas, dan un porcentaje con relación a la viscosidad del mencionado mucus no tratado, una reducción de la mencionada viscosidad igual o menos entre a debido a la quimotripsina disminuída de 5 % y además a la de la tripsina aumentada de 5 % (los porcentajes están siempre valorados con relación a la viscosidad del mencionado mucus no tratado). El citado procedimiento comprende igualmente los tratamientos necesarios para purificar los productos obtenidos desde que estos últimos se han revelado insensibles a los inhibidores tripsicos.

20. Los microorganismos productores son seleccionados por medio de los que dan productos enzimáticos y que responden a dos condiciones: Prueba RMV positiva e insensibilizada a los inhibidores tripsicos. Mediante los microorganismos que convienen, el inventor está particular-

25.

376787



mente más interesado en los hongos del género *Streptomyces* y de la especie *fradiae*. Este hecho no puede ser considerado como limitativo en razón del gran número de microorganismos susceptibles de convenir.

5. A - Descripción de la prueba R.M.V.

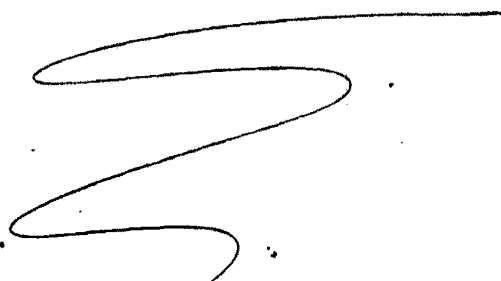
a) Preparación del producto enzimático a estudiar.

10. Se hace fermentar según las técnicas clásicas un microorganismo produciendo en cantidades notables mezclas de enzimas proteolíticas. Al final de la fermentación, el medio está filtrado, concentrado, liofilizado o atomizado: se obtiene así un producto enzimático bruto; o de preferencia, después de la filtración y concentración, el producto obtenido por precipitación con sulfato de amonio y secado en el vacío, se obtiene así un producto enzimático parcialmente purificado que, según la técnica clásica de Anson, debe dosificar por lo menos 1.000 unidades por mg.

15. Una unidad Anson (o en abreviatura U.A.) está aquí definida como la cantidad de enzima que, incubada durante 10 minutos a 25°C a pH 7,5 en presencia de hemoglobina desnaturalizada, libera de este substrato el equivalente de 1 μ g de tirosina, determinado por absorción fotométrica a 280 μ sobre el filtrado no precipitable al ácido tricloroacético.

b) Medida.

20. Se utiliza como substrato del mucus de ternera o

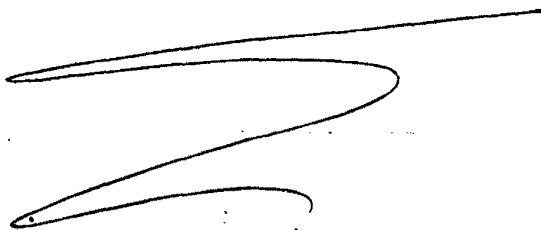




376787

- de cerdo. Inmediatamente después del sacrificio del animal con dieta desde 24 horas, se elimina a partir del estómago 3 secciones sucesivas del intestino alrededor de 1 metro cada una. Se liga una extremidad, y por presión suave, se hace salir de la otra extremidad el mucus superficial que se elimina; inmediatamente por presión fuerte o por raspadura de la pared intestinal anteriormente fundida, se recoge el mucus profundo, del cual se separa la fase soluble por lavado con 3 volúmenes de agua seguido de centrifugación. Se recoge de media 50 ml de mucus insoluble por animal; este mucus puede ser conservado varios días a -20°C , o utilizado inmediatamente para los estudios viscosimétricos.
- 5.
- 10.

- Se utiliza por estos estudios el microviscosímetro como-bandeja de Brookfield que permite trabajar sobre 1 g de mucus insoluble. La velocidad angular del cono móvil está regulada generalmente a 12 r/mn y la temperatura a 37°C . Una escala graduada de 0 a 100 permite determinar la viscosidad relativa por lectura directa. Con solo el mucus se regula el índice sobre 100, después se añade 0,1 ml de una solución tamponada a pH 7,5 que contiene el producto enzimático a estudiar. Si este producto es activo, la viscosidad baja rápidamente y se puede registrar la curva de reducción de la viscosidad en función del tiempo. Las enzimas de referencia tripsina, quimotripsina son
- 15.
- 20.
- 25.



376787



- utilizadas de preferencia bajo forma altamente purificada, denominando respectivamente 16.000 y 20.000 U.A./mg. Provocan sobre el mucus una reducción de viscosidad que alcanza un rellano de, por lo menos, 30 mn, de tal forma que la duración de un ensayo puede ser fijada a 30 mn.
5. Para una concentración de 50 U.A. por gramo de mucus, estas enzimas provocan una reducción de viscosidad de 20 %; para una concentración 5 veces superior, por ejemplo, de 250 U.A. por g de mucus, provocan una reducción de viscosidad que es generalmente de 60 y 40 % respectivamente.
10. El mucus de ternera o de cerdo varía por otra parte de un animal a otro, de tal manera que estos resultados pueden variar según la muestra de mucus utilizada; si se obtienen resultados demasiado alejados de los valores precedentes,
15. se puede bien eliminar la muestra de mucus, bien tratarlo por precipitación fraccionada y puesta en suspensión, de manera que se puedan lograr aproximadamente estos valores.
- Con tal muestra de mucus, se determina la reducción de viscosidad provocada por 250 U.A. del producto enzimático a estudiar por 1 g de mucus. Si esta reducción está comprendida de preferencia entre 40 y 60 %, y más generalmente entre 35 y 65 %, el producto enzimático está seleccionado como satisfactorio a la prueba R.M.V. y por lo tanto, como capaz de provocar la mejora buscada de la viscosidad del mucus.
- 20.
- 25.

376787

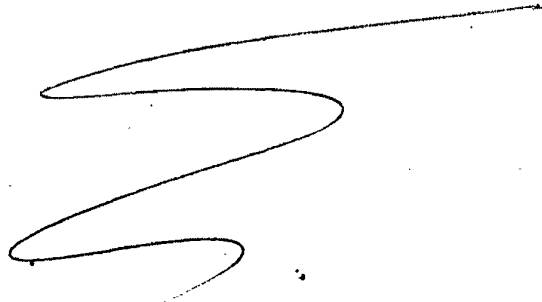


La acción de las enzimas sobre el mucus está ilustrada en la figura 1 que da en función del tiempo (en mn) en abcisas el porcentaje de reducción en ordenadas. Esta figura muestra las curvas obtenidas con la tripsina (curva nº 1) y la quimotripsina (curva nº 2), con una enzima que no satisface la prueba R.M.V. por defecto (parafina curva nº 3) con una enzima que satisface exactamente la prueba R.M.V. (enzima de Streptomyces fradiae lote 2, curva nº 4) en fin con una enzima que no satisface la prueba R.M.F. por exceso (enzima de Bacillus subtilis, curva nº 5. Los resultados obtenidos por la utilización de estas enzimas en alimentación animal están por otra parte descritos más adelante (ejemplo 1).

c) Modo de acción - Caracterización indirecta.

Si ciertos productos enzimáticos provocan así una reducción determinada de la viscosidad del mucus, es porque tienen una acción determinada sobre las proteínas, que en el mucus, forman puentes entre las macromoléculas de mucinas y de mucopolisacaridos. De tales productos se derivan las proteínas hasta el estado polipeptidas sin ir sistemáticamente hasta el estado ácidos aminados.

Esta observación permite reconocer indirectamente los productos que satisfacen la prueba R.M.V.; éstos son los productos que degradan las proteínas del mucus, y por extensión algunas otras proteínas, formando polipep-





376787

tidos cuyo tamaño medio es comparable a la de los polipeptidos obtenidos por acción de la tripsina y la quimotripsina sobre estas mismas proteínas.

5. El procedimiento directo y el procedimiento indirecto de reconocimiento de los productos que satisfacen la prueba RMV dan resultados que, sin ser enteramente idénticos, son sin embargo, ampliamente concordantes; se podrán entonces seleccionar estos productos por uno o por otro de estos procedimientos.

10. B - Especificación de la prueba RMV.

15. La selección por la prueba RMV es una de las condiciones esenciales que deben cumplir los productos enzimáticos utilizables según la invención. Otra de las condiciones, que se verá más adelante (ejemplo 1), es que estos productos sean prácticamente insensibles a los inhibidores tripsicos.

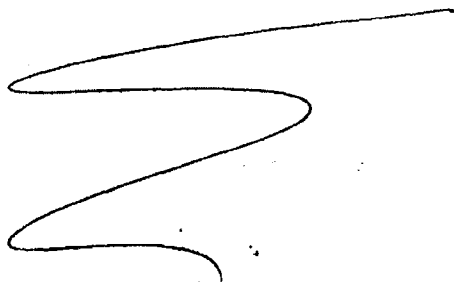
20. Los productos enzimáticos^{que} satisfacen la prueba RMV son ya una pequeña minoría cara a la gran mayoría de los productos que no satisfacen esta prueba, bien por defecto, bien por exceso. Los productos que satisfacen la prueba RMV y que por otra parte son prácticamente insensibles a los inhibidores tripsicos, constituyen por lo tanto, una minoría aún más reducida.

25. La doble condición precedente puede ser llamada característica. En efecto, así como lo veremos más adelante



376787

- en un ejemplo particular (ejemplo 1), la experiencia muestra que los productos enzimáticos que tienen esta doble condición tienen una influencia favorable sobre el crecimiento de los animales, y más generalmente una eficacia real en las composiciones alimenticias, dietéticas y farmacéuticas según la invención. Inversamente, así como lo veremos en el mismo ejemplo, los productos que no cumplen esta doble condición tienen sobre el crecimiento de los animales una influencia desfavorable, nula o ligera e inconstante; esta influencia es, por lo tanto, del mismo orden que la de los productos enzimáticos ya propuestos en alimentación animal antes de la invención, y que no han podido finalmente imponerse en el mercado en razón de la mediocridad de los resultados obtenidos.
- 5.
- 10.
15. El gran interés de una selección de productos enzimáticos por el procedimiento de la doble condición característica precedente es que permite reconocer, de una forma práctica, rápida y eficaz, los productos susceptibles de convenir al fin perseguido con una probabilidad de éxito enormemente grande. Esta selección previa evita largas y costosas experiencias en importantes series de animales, que han sido probadas, pero que no han conducido hasta aquí más que a resultados insuficientes para ser utilizados en la práctica.
- 20.
25. La presente selección de productos enzimáticos





376787

- según la prueba RMV no difiere apenas de la descrita en la especificación británica provisional nº 9619 del 21.2.69 que consistía en comparar el producto enzimático consigo mismo por medio de dos concentraciones diferentes. El producto satisfactorio debía tener sobre el mucus intestinal una acción que no aumentase más que débilmente con el aumento de la concentración. Así, para una concentración 5 veces superior a la que provoca en 60 mn una reducción de viscosidad de 20 % la reducción debía estar comprendida de preferencia entre 40 y 60 %. Este método tenía el inconveniente de exigir la determinación previa, por aproximaciones sucesivas, de la concentración provocando una reducción de 20 %, ahora bien, esta determinación era relativamente imprecisa para tal valor de la reducción de la viscosidad.
- 5.
- 10.
- 15.

El método de selección actual que consiste en comparar directamente in vitro el producto enzimático con la tripsina y la quimotripsina da resultados tanto más seguros cuanto más equivalentes sean.

- 20.
- Para preparar productos enzimáticos conforme a la invención se ha tenido en cuenta dos fuentes de Streptomyces fradiae (nº 1998 y nº 2019 de la colección del Museo Nacional de Historia Nacional de París).

- 25.
- Por las técnicas clásicas de fermentación, se pone en cultivo una de las fuentes en un medio de produc-

376787



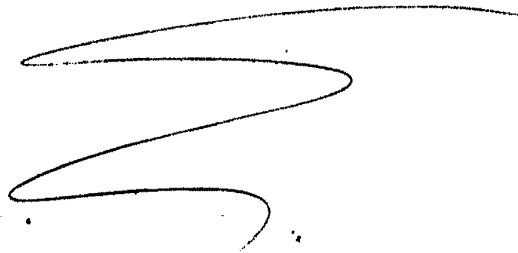
5. ción industrial cuya composición en g/l de media es la siguiente: harina de soja 30 g/l, glucosa 30 g/l, fosfato dipotásico 0,8 g/l, carbonato de calcio 10 g/l; pH 7,0. La temperatura está fijada a 28°C y la aireación a 0,3 volumen de aire inerte por volumen del medio y por minuto.

10. En estas condiciones, el Streptomyces fraidiae no produce antibióticos y produce por el contrario, por lo menos, 5 proteasas y 2 peptidasas. Estas diferentes enzimas no pueden ser puestas en evidencia más que por largas técnicas analíticas impracticables en rutina, sin embargo, es necesario evitar en lo posible la formación de ciertas de estas enzimas y notablemente peptidasas que en concentraciones importantes son netamente indeseables. Pero lo esencial es que la mezcla enzimática obtenida satisfaga la prueba RMV que es una ejecución rápida y puede por lo tanto, ser adaptada a la rutina industrial.

15. En general, esta mezcla enzimática no satisface por defecto la prueba RMV en el comienzo de la fermentación, satisface la prueba RMV, en la mitad de la fermentación. Utilizando el método descrito anteriormente, se para la fermentación cuando la acción del mucus de la mezcla enzimática obtenido comienza a traspasar la de la qui motripsina, sin alcanzar aún la de la tripsina. Esta duración de la fermentación puede variar de una fabricación a otra, en función de variaciones mínimas y prácticamente

20.

25.

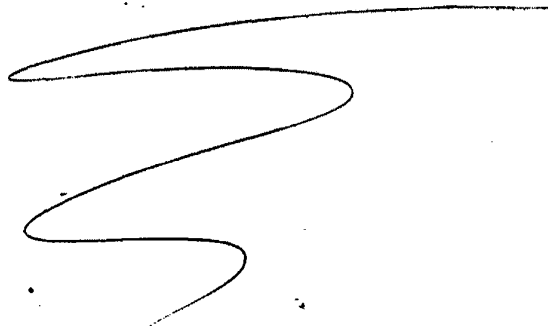




376787

incontrolables de las condiciones de la fermentación; esta duración queda, sin embargo, comprendida generalmente entre 60 y 84 h, y la dosificación total del medio fermentado es generalmente cercada a 3.000 U.A./ml.

5. Por las técnicas clásicas de extracción, pero siempre bajo el control de la prueba RMV se prepara a partir de este medio fermentado los productos siguientes:
- PRODUCTOS A : el medio fermentado filtrado está concentrado en vacío; se obtiene un producto enzimático bruto líquido en dosificación de, por lo menos, 50.000 U.A./ml.
10. PRODUCTO B : A partir de un producto A, por atomización, se obtiene un producto enzimático bruto, sólido en dosificación de, por lo menos, 100 U.A./mg.
- PRODUCTO C : A partir de un producto A, por precipitación salina (sulfato de amonio) y secado en vacío, se obtiene un producto enzimático parcialmente purificado en dosificación de, por lo menos, 1.000 U.A./mg.
15. PRODUCTO D : A partir de un producto A, por una serie de precipitaciones con sulfato de amonio y disolventes especialmente la acetona seguidos de puesta en solución, y por secado en vacío del precipitado final, se obtiene un producto enzimático medianamente purificado en dosificación de, por lo menos, 10.000 U.A./mg y presentando una monodispersión relativa electroforética de la actividad enzimática.
- 20.
- 25.



376787



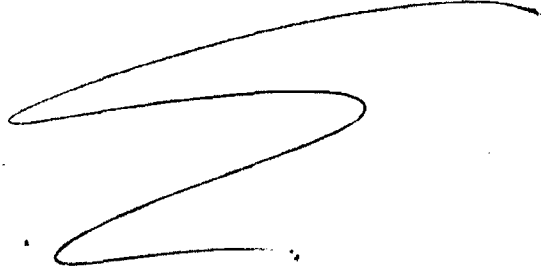
5. PRODUCTO E : A partir de un producto D por electroforesis, en fase líquida, o cromatografía sobre columna, diálisis y liofilización, se separa la enzima predominante bajo forma altamente purificada en dosificación de, por lo menos 50.000 U.A./mg y presentando una monodispersión electroforética absoluta.

10. Todos estos productos satisfacen por definición la prueba RMV. Para ser utilizados según la invención, deben ser aún prácticamente insensibles a los inhibidores tripsicos, como se verá más adelante (ejemplo 1). La experiencia muestra que este es el caso de los productos precedentes. Estos productos constituyen en consecuencia un grupo particular de productos enzimáticos utilizables según la invención. Por otra parte, siempre por la puesta
15. en práctica de la prueba RMV, otros grupos particulares de productos enzimáticos utilizables según la invención pueden ser obtenidos a partir de otros Streptomyces además del fradiae, o a partir de microorganismos pertenecientes a otros géneros, especialmente al género Bacillus.

20. Los productos A, B o C definidos anteriormente son utilizables para la preparación de compuestos alimenticios para animales que podrán ser formulados sobre la base de los ejemplos siguientes:

A - Ejemplos en ratas.

25. EJEMPLO 1 - Ratas que reciben un alimento de Mc Collum.





376787

La composición de este alimento es la siguiente: azúcar 60 %, harina de trigo 12 %, caseína 18 %, levadura 3 %, sebo 3 %, sales de Mc Collum 4 %.

5. Ratas blancas albinas, de tres semanas y pesando alrededor de 40 g, se reparten a razón de 5 machos o 5 hembras por jaula; reciben el alimento a voluntad, así como el agua para bebida; se pesan individualmente 2 veces por semana durante 3 semanas, el crecimiento cotidiano medio es entonces determinado entre grupos de 10 animales (5 machos y 5 hembras).

10. El grupo testigo recibe el alimento de Mc Collum. Los grupos experimentales reciben el mismo alimento complementado con enzimas, bien en una dosis de 100 UA/g, bien en una dosis de 1.000 UA/g. Admitiendo que una rata en crecimiento consume por día el 1/10 de su peso en alimento (bien 10 g de alimentos por día, para una rata de 100 g) estas dosis corresponden respectivamente a 10.000 y 100.000 U.Á. por kg. de peso vivo y por día.

15. Las enzimas utilizadas son aquellas en que la acción sobre el mucus está ilustrada en la figura 1. Otra enzima S.F. lote 2 (S.F. = Streptomyces fradiae) que provoca sobre el mucus una reducción de viscosidad de 50 %, han utilizado las enzimas S.F. lote 1 y S.F. lote 3 que provocan sobre el mucus una reducción de viscosidad de 40 y 60% respectivamente. Estos lotes satisfacen la prueba RMV to-

25.



376787

5. mados en el sentido más amplio, ya que provocan una reducción de viscosidad comprendida entre 35 y 65 %, pero solamente el lote 2 satisface la prueba RMV en sentido estricto preferido normalmente. Estos 3 lotes corresponden al producto C indicado anteriormente y denominado alrededor de 2.000 U.A./mg.

Los resultados obtenidos están dado por la tabla I.

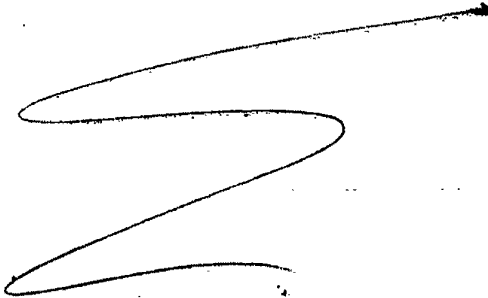
T A B L A I.

10. Influencia de las enzimas sobre la reducción de viscosidad del mucus (según prueba RMV) y sobre el crecimiento de las ratas.

15. Naturaleza de la enzima.	Reducción de viscosidad %	Sin enzima g/día	<u>Crecimiento de las ratas</u>			
			Con 100 UA por g de alimento		Con 1.000 UA por g. de alimento	
			g/día	%	g/día	%
	0	2,85				
Papaina	30		2,85	100	2,85	100
SF Lote 1	40		3,45	121	3,40	119
SF Lote 2	50		4,15	145	4,05	142
SF Lote 3	60		3,25	114	2,95	103
B.S.	80		3,00	105	2,40	84

SF: enzima de Streptomyces fradiae

BS: enzima de Bacillus subtilis





376787

5. La enzima SF lote 2 cuya acción sobre el mucus está exactamente comprendida entre la de la tripsina y de la quimotripsina (reducción de viscosidad : 50 %) provoca un aumento de la velocidad de crecimiento de las ratas comprendido entre 40 y 45 % para las 2 dosis utilizadas.

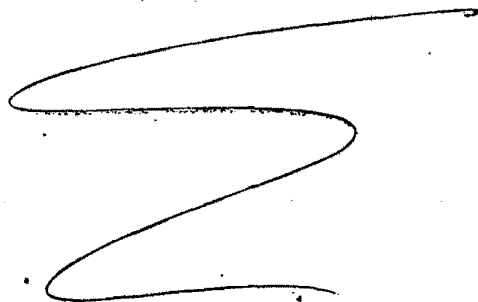
Para la enzima SF lote 1 cuya acción sobre el mucus es comparable a la de la quimotripsina (reducción de viscosidad : 40 %) este aumento es más débil, pero queda cerca de 20 % para las dos dosis utilizadas.

10. Para la enzima SF lote 3 cuya acción sobre el mucus es comparable a la de la tripsina (reducción de viscosidad : 60 %) este aumento es aún de 14 % en dosis débil, pero se vuelve casi nulo con una fuerte dosis.

15. Así como los lotes de enzimas de SF que satisfacen de forma inigual la prueba RMV, tienen una influencia favorable inigual sobre el crecimiento de las ratas.

20. Por otra parte, cuando se pone en fermentación un SF sin aplicar el procedimiento de fabricación según la invención, se obtienen generalmente lotes de enzimas que no satisfacen la prueba RMV por exceso, y que tiene sobre el crecimiento de las ratas una influencia netamente desfavorable.

25. La papaina que no satisface la prueba RMV por defecto no tiene influencia sobre el crecimiento de las ratas.



376787



- Una enzima de Bacillus subtilis que no satisfi-
ce la prueba RMV por exceso, presenta con dosis débil una
ligera influencia favorable sobre el crecimiento de las ra-
tas, pero esta influencia es inconstante; por otra parte,
5. con dosis fuerte, se vuelve netamente desfavorable. En la
autopsia, la pared intestinal de las ratas que han recibi-
do esta fuerte dosis muestra a simple vista signos eviden-
tes de una hipersecreción de mucus que sirve para expli-
car la disminución del crecimiento observado.
10. En fin, la tripsina y la quimotripsina provocan
un ligero e inconstante aumento de la velocidad de creci-
miento de las ratas, que queda siempre inferior a 10 %.
Estas enzimas pancreáticas que, in vitro tienen siempre
sobre el mucus una acción comparable a la de las enzimas
15. SF lotes 1, 2 y 3, tiene por lo tanto, in vivo sobre el
crecimiento de las ratas una acción netamente inferior.
Esta anomalía puede explicarse del hecho de que la tripsi-
na y la quimotripsina en exceso son susceptibles de ser
bloqueadas in vivo por los inhibidores tripsicos endógenos,
20. tales como el inhibidor pancreático de Kunitz; por el con-
trario, la enzima predominante en los lotes 1, 2 y 3 obte-
nidos a partir de Streptomyces fradiae es prácticamente in-
sensible a este inhibidor, de la misma manera que es prác-
ticamente insensible a los inhibidores exógenos, tales co-
25. mo el inhibidor de soja.



376787

EJEMPLO II -

Ratas que reciben un alimento rico en proteínas de soja.

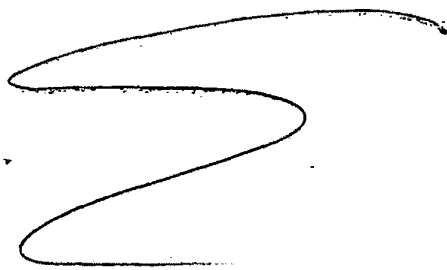
5. Este alimento, normalmente utilizado para el crecimiento de los pollos, tiene la composición siguiente: harina de maíz 60 %, harina de soja 33 %, compuesto mineral y vitamínico 4 %. El ensayo se efectúa sobre grupos de 10 ratas machos, en las mismas condiciones generales que en el ensayo precedente.

10. El grupo testigo tiene un crecimiento medio de 5,25 g/día.

15. El grupo experimental 1 que recibe el mismo alimento suplementario en enzima SF lote 2 en la dosis de 1.000 UA/d (lo que corresponde a alrededor de 100.000 UA por kg de peso vivo y por día) tiene el mismo crecimiento medio diario.

20. El grupo experimental 2 que recibe el mismo alimento, pero recibe agua para beber en la que se ha disuelto la enzima SF lote 2 en una dosis de 500 UA/ml (lo que corresponde igualmente a alrededor de 100.000 UA por kg de peso vivo y por día) tiene un crecimiento medio de 7,3 g/día, que está por consiguiente aumentado en 39 %.

25. El fracaso observado por el grupo experimental 1 no ha sido debido a la presencia en la soja del inhibidor tripsico de Northrop, ya que este inhibidor había sido



376787



- destruido por el tratamiento térmico efectuado normalmente por el proveedor de esta materia prima. Este fracaso es más bien debido al hecho de que la enzima parece tener una afinidad particular por las proteínas de soja, las
5. que cuando se añaden en el alimento en concentración elevada, pueden captar la totalidad de la enzima; desde ese momento, esta enzima no podrá actuar más sobre las proteínas del mucus cuya viscosidad no será ya reducida. Pero
10. si se añade la enzima en el agua de la bebida en lugar de añadirla en el alimento, esta captación será evitada en parte, de donde el éxito obtenido con el grupo experimental 2. Es por lo tanto preferible en general añadir la enzima en el agua de la bebida; la experiencia muestra por
15. otra parte que la estabilidad de la enzima en solución es suficiente para que este modo de administración sea practicable en las crianzas industriales.

EJEMPLO III -

Trabajos sobre asa intestinal solitaria.

20. Estos trabajos tienen por objeto poner en evidencia directamente el aumento de la velocidad de absorción de los alimentos a través de la pared intestinal.

25. Se opera con cinco ratas que han estado a dieta durante 24 horas, pesando alrededor de 150 g y anestesiadas con uretano. Después de abrir la cavidad abdominal, se aísla alrededor de 10 cm de ileón, estando cada extre-



376787

5. mitad puesta en comunicación con el exterior; se lava el ileón, después se introduce 0,5 ml. de una solución de hidrolisato de caseína conteniendo 2,5 mg de nitrógeno. Se deja la solución en el ileón durante 10 mn después se recoge y se introduce una solución de enjuagado que se recoge igualmente; se valora el nitrógeno residual en las soluciones así recogidas. En la misma rata, se vuelve a hacer el mismo ensayo introduciendo previamente 0,05 ml de una solución con 0,5 mg/ml de enzimas SF lote 2, alrededor de 50 U.A.
- 10.

15. Se observa que el porcentaje de nitrógeno absorbido varía mucho de un animal a otro en los ensayos testigo sin enzima y que tiene una media de 5 %; en los ensayos experimentales este porcentaje es menos variable y es mucho más elevado ya que alcanza una media de 17 %.

20. Por esta misma técnica, se puede estudiar la velocidad de absorción de los otros alimentos, y su aumento eventual bajo la influencia de la enzima. Se observa que este aumento es en general más grande para los prótidos que para los glúcidos o los lípidos. El aumento de la velocidad de crecimiento por encima debe hacerse, por lo tanto, en beneficio de los tejidos musculares del animal antes que en beneficio de las sustancias de reserva; se puede, por lo tanto, decir que el crecimiento del animal
25. se mejora no solo en cantidad, sino también en calidad.

376787



5. Por esta misma técnica, se puede igualmente estudiar la velocidad de absorción de los medicamentos, cuyo paso a través de la pared intestinal puede por otra parte estar o no bajo la dependencia de un transportador específico. Se observa que esta velocidad de absorción es en general aumentada por la enzima, pero de forma inigual siguiendo los medicamentos.

B - Pruebas en pollos.

EJEMPLO IV -

10. Pollos criados solos.

Unos pollos machos de la raza Arbor-Acres primeramente son criados todos juntos y reciben el mismo alimento de entrada. Con un tiempo de 12 días, se reparten en 4 grupos de 25 teniendo el mismo peso medio (124 g) y la misma desviación standard (3,28).

15. El grupo testigo 1 recibe un alimento a base de maíz y de soja con una concentración débil de proteínas (16%). Al fin del ensayo con un tiempo de 58 días, después de 46 días de ensayo, el peso medio es de 1,430 g y el índice de consumo (relacionando el peso de alimento consumido al peso de los animales) es de 2,30.

20. El grupo experimental 1 recibe el mismo alimento suplementado por 4 g/Kg del producto B definido anteriormente, con una dosis de 100 U.A./mg; la dosis de enzima es así de 400 UA/kg de alimento, lo que corresponde a

25.



376787

alrededor de 40.000 UA/kg de peso vivo y por día. Al terminar el ensayo, el peso medio es de 1,553 (+ 8%) y el índice de consumo de 2,15 (-7 %).

5. El grupo testigo 2 recibe un alimento a base de maíz y soja, teniendo una concentración normal en proteínas (22 %). Al terminar el ensayo, el peso medio es de 1,772 g (+ 6 %) y el índice de consumo de 1,98 (- 5 %).

EJEMPLO V -

Pollos criados en batería.

10. El ensayo comporta en 2 lotes alrededor de 6.000 pollos de la raza Vanguard-Garrison criados en batería. El lote testigo recibe en forma de harina un alimento comercial a base de soja y de maíz en el cual se encuentra mediante análisis un 21% de proteínas y 5 % de lípidos;
15. este alimento está garantizado de contener 8 mg/kg de penicilina-procaina y 25 mg/kg de tetraciclina. El lote experimental recibe el mismo alimento suplementado por 400 mg/kg del producto C definido anteriormente, dosificado en 2.000 U.A./mg; la dosis de enzima es así de 800 UA por kg de alimento, lo que corresponde a alrededor de 80.000 UA/kg de
20. peso vivo por día.

25. En el día 30 del ensayo, los pollos tienen aparentemente el mismo desarrollo en los dos lotes, pero cada pollo ha consumido de media 1,080 g de alimento en el lote testigo y solamente 903 g en el lote experimental, de donde

376787



se deduce que hay una economía de alrededor 16 % del alimento.

A partir de 40 días, se desarrolla en el conjunto de la crianza una epidemia a la que el lote experimental resiste mucho mejor.

5.

Al terminar el ensayo a los 60 días, la mortalidad es de 5 % para el lote testigo y solo de 1,6 % para el lote experimental.

10.

Los pesos medios son de 1,346 g y 1,319 g respectivamente. Esta pequeña diferencia, por lo menos, en el grupo experimental se explica por el hecho que, en este lote, unos animales débiles de constitución han sobrevivido, habiendo muerto probablemente con la ausencia de la enzima.

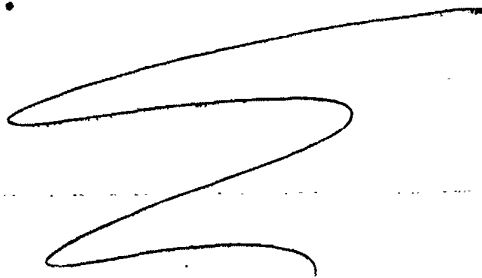
15.

Los índices de consumo son de 2,8 y de 2,63 respectivamente, de donde se deduce una economía de 6,5 % en el alimento para el lote experimental.

20.

Ensayo de control: Al principio del ensayo principal, se descuenta en cada lote un grupo de 25 pollos que son criados en solitario en un local separado donde las condiciones higiénicas son mejores. La mortalidad es nula para estos grupos. Los pesos medios son de 1,603 g para el grupo testigo; y de 1,746 g (+ 9 %) para el grupo experimental. Los índices de consumo son de 2,68 y de 2,41 (-10%) respectivamente.

25.



376787



EJEMPLO VI Repetición del Ejemplo V.

5. Sin embargo, el ejemplo V corresponde a un ensayo efectuado en pleno verano con un gran calor con el que los animales han sufrido visiblemente, mientras que el ejemplo VI corresponde a un ensayo efectuado en otoño en unas condiciones climatológicas más normales.

Al terminar el ensayo después de 60 días, las mortalidades son de 7,9 % para el lote testigo y de 4,8 % para el lote experimental.

10. Los pesos medios son de 1,338 g y de 1,356 g respectivamente.

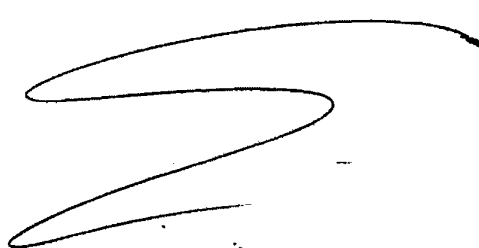
Observación.

15. Estos ensayos sobre pollos han sido efectuados antes de haber sospechado el riesgo de captación de la enzima por las proteínas de soja, y de haberlo remediado por adición de la enzima en el agua de la bebida, como en el ejemplo II. Se puede obtener sobre pollos resultados mucho mejores, y notablemente aumentos en la velocidad de crecimiento comparables a las observadas en el ejemplo II (+ 39 %), añadiendo la enzima en el agua de la bebida en vez de añadirla en el alimento.

20.

C - Ensayos en terneras.

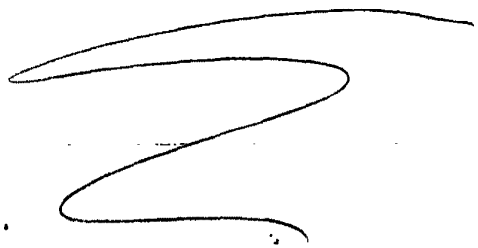
25. En este caso particular, además de su acción principal sobre el mucus intestinal, un producto enzimático, según la invención, puede ejercer también una acción



376787



- no despreciable sobre el mismo alimento. En efecto, entre el momento en que la leche reconstituida a partir de leche en polvo se eleva a 37°C, y el momento en que es consumida por los terneros, pasa normalmente alrededor de 1/2 hora.
5. Esta duración es suficiente para que, en medio líquido a 37°C, las proteínas de la leche sean degradadas parcialmente por el producto enzimático, lo que contribuye también en cierta forma a mejorar globalmente el crecimiento de los terneros.
10. Los ejemplos V y VI muestran que en la crianza en granja industrial, la mortalidad es netamente descendida en los lotes experimentales y esta constatación puede recibir diferentes interpretaciones.
15. En particular, se sabe que los microorganismos patógenos son normalmente abundantes en la capa profunda de mucus, y que los coccidios u otros parásitos contribuyen amenudo a la formación de criptas intestinales donde se alojen; cuando estos microorganismos, estos coccidios o estos parásitos son envueltos en un mucus demasiado viscoso, pueden escapar a la acción de los antibióticos, anticoccidios o antiparásitos normalmente añadidos en los alimentos. Las enzimas capaces de provocar una reducción determinada de la viscosidad del mucus intestinal pueden tener, por lo tanto, un efecto activador sobre los antibióticos, los anticoccidios y los antiparásitos; así puede explicarse
- 20.
- 25.





376787

5. en parte la disminución de mortalidad observada para los lotes experimentales. Los productos enzimáticos, según la invención, pueden por lo tanto, permitir una reducción de la dosis de los antibióticos, de los anticoccidios y de los antiparásitos normalmente añadidos en los alimentos compuestos para los animales, sin disminución de la protección asegurada por estos tres tipos de productos.

10. Por otra parte, los productos enzimáticos, según la invención, permiten aumentar la velocidad de absorción a través de la pared intestinal de ciertos medicamentos veterinarios, así que se puede poner en evidencia por la técnica escrita en el ejemplo III.

15. Estos productos son, por lo tanto, utilizables para la preparación de diferentes composiciones veterinarias.

20. Los compuestos alimenticios para los animales comprenden en asociación con un excipiente fisiológicamente aceptable, por lo menos, uno de los productos A, B o C. Son administrados en una dosis de 1.000 a 20.000 UA por kg de peso corporal y por día. Por excipiente se entiende bien los sólidos, tales como la lactosa, bien los disolventes, bien aún los envoltentes que protegen los productos enzimáticos antes de su utilización.

25. Las composiciones veterinarias actuando al nivel del mucus intestinal para facilitar la absorción de



376787

Los medicamentos contiene, por lo menos, uno de los productos A, B o C y son administradas en una dosis de 5.000 a 200.000 UA/kg de peso corporal y por día.

La forma de administración más conveniente en los dos casos es la que conviene por vía oral.

5.

Los resultados descritos precedentemente relativos a los ensayos efectuados en los animales son adaptables a los seres humanos. Con este objeto y a fin de obtener con toda seguridad el efecto deseado, en lugar de utilizar un producto enzimático bruto o parcialmente purificado, se tomará un producto medianamente purificado, por ejemplo, el producto D. Se realizará así unas especialidades dietéticas y farmacéuticas actuando al nivel del mucus intestinal. Las composiciones dietéticas comprenden,

10.

por lo menos, uno de los productos D o E, y son administradas en una dosis de 1.000 a 20.000 UA/kg de peso corporal y por día.

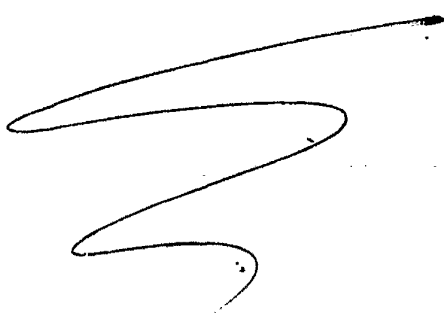
15.

Las composiciones farmacéuticas actuando al nivel del mucus intestinal para mejorar el anabolismo o aumentar la eficacia de los medicamentos contienen, por lo menos, uno de los productos D o E y son administradas en una dosis de 5.000 a 200.000 UA por kg de peso corporal y por día.

20.

Como el mucus intestinal, el mucus bronquial debe en parte su viscosidad a la presencia de macromoléculas

25.



376787



de mucinas envueltas entre ellas por puentes de proteínas. El principio de una acción determinada sobre la viscosidad del mucus por acción determinada sobre las proteínas de este mucus es, por lo tanto, igualmente aplicable.

5. De este hecho, la tripsina y la quimotripsina han sido ya propuestas en terapéutica bronquial, pero su utilización se ha encontrado limitada por diversas razones y notablemente por la existencia en el mucus bronquial de inhibidores tripsicos, por otra parte diferentes del inhibidor de Kunitz.
- 10.

- Por el contrario, la experiencia muestra que estos inhibidores no tienen acción sobre los productos enzimáticos perteneciendo al grupo particular descrito anteriormente. Estos productos son, pues, utilizables para reducir moderadamente la viscosidad del mucus bronquial, lo que facilitará la evacuación del mucus en exceso y la acción de los antibióticos.
- 15.

- La mucosa bronquial siendo más frágil y menos extendida que la mucosa intestinal, estos productos que podrán ser dados en aerosol, o bajo otra forma conveniente de administración, serán de preferencia unos productos muy purificados, tales como el producto D para los animales y los productos D o E para los seres humanos, y serán utilizados en dosis relativamente bajas comprendidas generalmente entre 500 y 50.000 UA por kg de peso corporal y
- 20.
- 25.

376787



por día.

5. Como el mucus intestinal, el mucus cervical debe en parte su viscosidad a unas macromoléculas de tamaño particularmente grande, envueltas entre ellas por puentes de proteínas. El principio de una acción determinada sobre la viscosidad del mucus por acción determinada sobre las proteínas de este mucus es igualmente aplicable.

10. La acción determinada sobre la viscosidad del mucus cervical aparece netamente deseada en la práctica de la inseminación artificial en los bovinos, que está en pleno desarrollo actualmente. En efecto, la tasa de éxito en la primera intervención no es aún más que de 65 % de media, lo que puede explicarse en parte por el hecho de que un mucus cervical demasiado viscoso provoca amenudo
15. la formación de un verdadero botón cervical que viene a obturar el cuello del útero y a impedir la progresión de los espermatozoides.

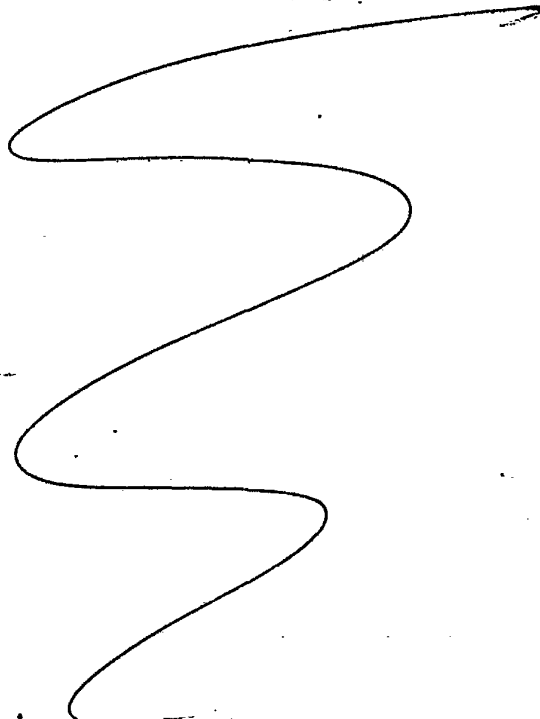
20. Por otra parte, es reconocido ahora que el éxito de una inseminación está en parte condicionado por la presencia en la simiente de una actividad tripsica suficiente, propia para asegurar la capacitación de los espermatozoides. Está igualmente reconocido que el mucus cervical puede contener inhibidores tripsicos.

25. Los productos enzimáticos pertenecientes al grupo particular definido anteriormente, teniendo una activi-



376787

- dad del tipo tripsico y estando generalmente insensibilizados a los inhibidores tripsicos, pueden por lo tanto, provocar una reducción determinada de la viscosidad del mucus cervical, y contribuir a la capacitación de los espermatozoides. Podrán así facilitar el tratamiento por los antibióticos de enfermos afectando las vías genitales, y aumentar la tasa de éxito en la primera intervención en inseminación artificial, como por otra parte en inseminación natural.
- 5.
10. Siendo las mucosas vaginal y uterina más frágiles y menos extendidas que la mucosa intestinal, los productos enzimáticos que servirán a la preparación de los óvulos serán de preferencia productos muy purificados, tales como el producto D para los animales y los productos D o E para los seres humanos y serán utilizados en dosis relativamente débiles (comprendidas generalmente entre 500 y 50.000 UA por kg de peso y por día).
- 15.



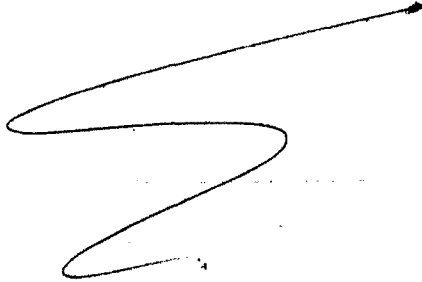
376787



T A B L A II.

Dosis a administrar por día y dosificación animal del producto enzimático, según las aplicaciones.

Dosificación animal del producto enzimático	Dosis a administrar por día					
	<u>Animales</u>			<u>Seres humanos</u>		
	<u>Terapéutica</u>		<u>Alimentación</u>	<u>Terapéutica</u>		<u>Diética</u>
	Nivel de acción.			Nivel de acción		
Mucus intestinal	Mucus bronquial	Mucus cervical	Mucus intestinal	Mucus bronquial	Mucus cervical	
50.000 UA/ml	} 5.000 a 200.000 UA/kg de peso corporal	}	} 1.000 a 20.000 UA/kg de peso corporal	}	}	
100 UA/mg						
1.000 UA/mg						
10.000 UA/mg	500 a 50.000 UA/kg de peso corporal	500 a 50.000 UA/kg de peso corporal	} 5.000 a 200.000 UA/kg de peso corporal	} 500 a 50.000 UA/kg de peso corporal	} 500 a 50.000 UA/kg de peso corporal	} 1.000 a 20.000 UA/kg de peso corporal
50.000 UA/mg						



376787



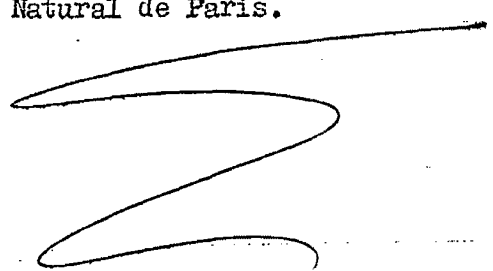
NOTA

5. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de Patente presentada en Inglaterra con el número y fecha siguiente: 9619/69
10. de 21 de febrero de 1.969, escogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita una Patente de Invención por 20 años, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA
15. PREPARACION DE PRODUCTOS ENZIMÁTICOS PROTEOLITICOS; caracterizándose por lo siguiente:

20. 1.- Procedimiento para la preparación de productos enzimáticos proteolíticos, que mejoran in vivo la viscosidad del mucus intestinal, bronquial y cervical, a partir de un microorganismo, caracterizado porque la fermentación del mencionado microorganismo está frenada desde que la
25. reducción de la viscosidad a 1 g de mucus intestinal a 37°C in vitro por 0,1 ml de una solución de 250 UA de productos enzimáticos obtenidos, estando ésta comprendida entre, al máximo, la reducción debida a 250 UA de quimotrip



376787

- sina pura más 5 % y, al mínimo, la reducción debida a 250 UA de quimotripsina pura menos 5 %, la disminución de la viscosidad del mucus estando indicada en porcentaje en relación a la viscosidad de los mencionados mucus no degradados y siendo para el mucus intestinal del cerdo o del ternero, respectivamente de 60 % para la tripsina y de 40 % para la quimotripsina después de 30 mn de degradación enzimática, la base a seleccionar debiendo igualmente proveer de productos insensibles a los inhibidores tripsicos y porque los mencionados productos enzimáticos son susceptibles de ser purificados.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la fermentación de la base productora es frenada desde que la reducción de viscosidad del mucus intestinal esté exactamente comprendida entre los valores de la de la tripsina y la de la quimotripsina.
- 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la base productora de productos enzimáticos está escogida entre Los Streptomyces.
- 4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la base es un Streptomyces fradiae.
- 5ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la base está escogida entre las bases números 1998 y 2019 de la colección del Museo Nacional de Historia Natural de París.
- 



5. 6ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la mencionada base está cultivada a 28°C sobre un licor nutritivo conteniendo un gramo por litro de media 30 g/l de harina de soja, 30 g/l de glucosa, 0,8 g/l de fosfato disódico, 10 g/l de carbonato de calcio, a un pH 7,0, la aireación es de 0,3 volúmenes de aire inerte por volumen del medio y por minuto, la duración de fermentación es de 60 a 84 horas y la dosificación final del medio de fermentación es del orden de 3.000 UA/ml.

10. 7ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el jugo filtrado de fermentación está concentrado en vacío hasta un litro de 50.000 UA/ml, por lo menos.

15. 8ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque por atomización del mencionado jugo concentrado, se obtiene un sólido dosificado de, al menos, 100 UA/mg.

20. 9ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque por precipitación con sulfato de amonio y secado en vacío el mencionado jugo concentrado, se obtiene un sólido dosificado de, por lo menos 1.000 UA/mg.

25. 10ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque por una serie de precipitaciones con sulfato de amonio y de acetona seguidas de redisolución, más tarde secado en vacío, se obtiene un sólido dosifica-



do de, por lo menos, 10.000 UA/mg.

5. 11ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque se hace sufrir una electroforesis en fase líquida o cromatografía sobre columna el producto obtenido según la reivindicación 10ª para obtener un producto dosificado de por lo menos, 50.000 UA/mg.

12ª.- Procedimiento para la preparación de productos enzimáticos proteolíticos; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

10. Esta Memoria consta de 39 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

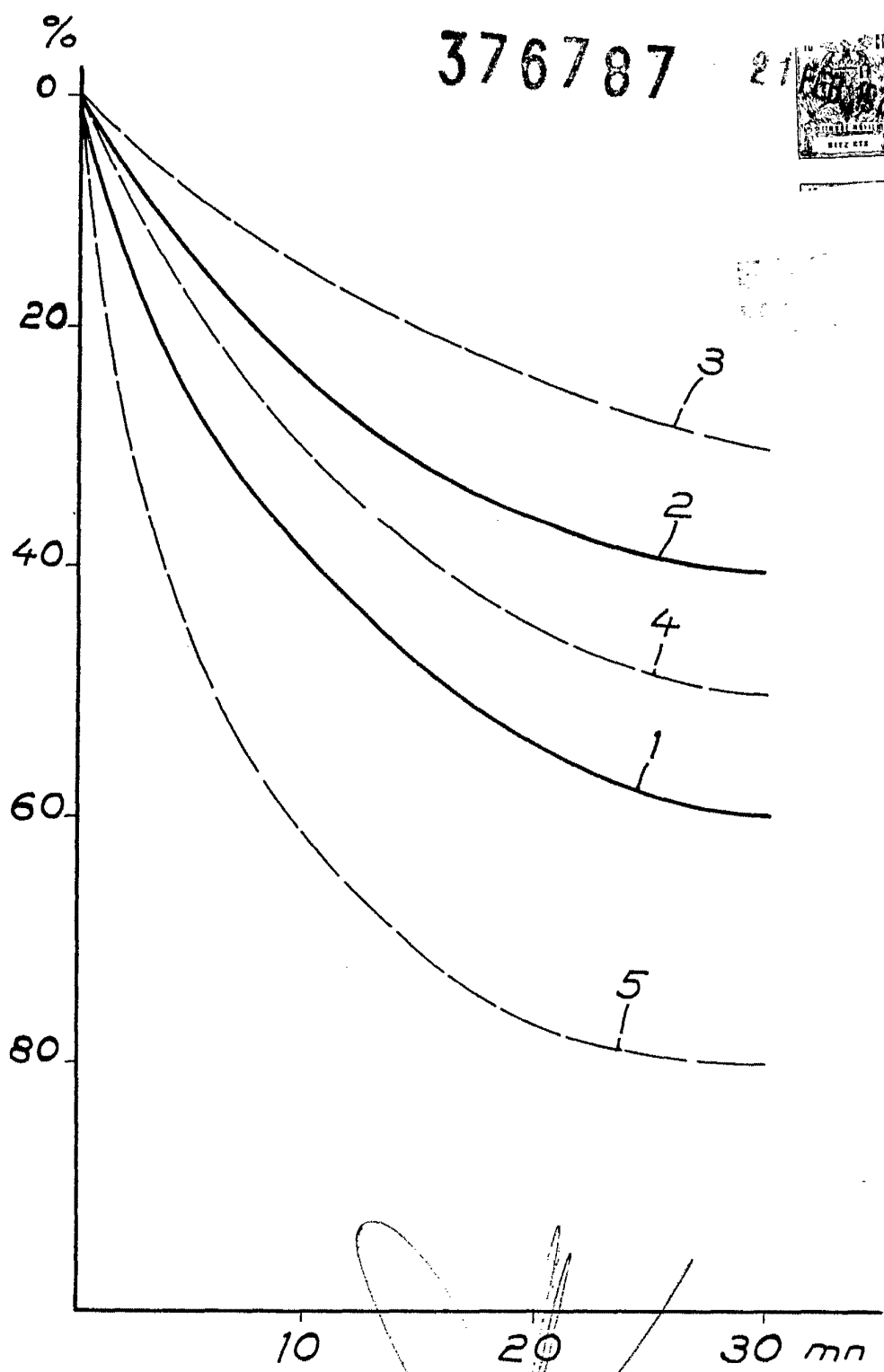
21 FEB. 1970

INSTITUTO DE FARMACOLOGIA ESPAÑOLA.

I. GOMEZ ACEBO Y MODEJ
e. n. Firmador: F. Hernández Ruiz

376787

21



[Handwritten signature or scribble]

2153100