

14 NOV. 1975

P.- 61.678
AL 11/11/75
NOV 1975

COMPLEXE ENZYMA-
TIQUE ET HOR-
MONAL"

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl. C07G

para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de L'OPOCHIMIE

entidad constituida con arreglo a las leyes del
Principado de Mónaco

establecida en Immeuble Industriel "L'Hercule", Rue
de l'Industrie, FONTVIEILLE, Principa-
do de Mónaco

por: "UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN COMPLEJO
ENZIMATICO".

8.11.75

- 1 -

**POOR
QUALITY**

La presente invención concierne a un procedimiento de preparación de un complejo enzimático hormonal estable, por extracción a partir del intestino delgado de los animales tales como el cerdo y el buey.

5

Es sabido que las dos partes que componen el intestino delgado, el duodeno y el yeyuno, producen pro-enzimas, enzimas y hormonas que juegan un papel importante en el metabolismo de la digestión y de la asimilación de los alimentos.

10

En las enzimas presentes en el duodeno, se hallan por ejemplo disacaridasas que liberan glucosa a partir de los disacáridos, peptidasas que descomponen los dipéptidos y entre las cuales se halla la leucilprolinasa que libera leucina, y muy particularmente la enteroquinasa que es la enzima capaz de activar el tripsinógeno y el quimotripsinógeno del páncreas. En el yeyuno no se encuentra enteroquinasa, pero se encuentran en mayor cantidad ciertas sacaridasas.

15

Por tanto, es interesante poner a punto una técnica que permita extraer estas enzimas, pro-enzimas y hormonas a partir del intestino delgado entero sin desnaturalizarlas para permitirles conservar su actividad total con vistas a acondicionarlas en la forma de medicamento.

20

25

8.11.75

En efecto, es sabido que si se toma el intestino y se tritura, una parte importante de la actividad buscada desaparece de tal suerte que si se recoge simplemente el líquido obtenido por aplastamiento del intestino, se aprecia que una gran parte de las enzimas o de las hormonas ya no están presentes, dado que las mismas se encuentran en el interior de las células del tejido muscular donde aquéllas están fijadas sobre las vellosidades del intestino. En particular, se ha podido demostrar el hecho de que la enteroquinasa se halla en gran parte en la pared interior del duodeno. Si se procede a una simple extracción acuosa del intestino, se observa que las enzimas endocelulares y las enzimas fijadas íntimamente al tejido externo del intestino no se extraen prácticamente.

Por otra parte, las extracciones efectuadas con ayuda de los disolventes orgánicos desnaturalizan con mucha frecuencia los productos buscados o los hacen inactivos. Además, durante la precipitación, se pierde, bien sea por desnaturalización, o bien por inactivación, la casi totalidad de ciertas enzimas u hormonas.

El objeto de la presente invención es remediar los inconvenientes anteriormente citados proporcionando un procedimiento que permite obtener un complejo enzimático y hormonal que contiene la casi totalidad de las

enzimas y de las hormonas del intestino delgado con su actividad inicial, con vistas particularmente a la utilización de este complejo como medicamento para el tratamiento de las afecciones intestinales debidas a una

5 carencia enzimática u hormonal.

Según la invención, el procedimiento de preparación de un complejo enzimático y hormonal estable a partir del intestino delgado se caracteriza por el hecho de que se pone en presencia del intestino delgado,

10 fresco o conservado por el frío, una solución acuosa de ácidos cólicos y de éter mono-para-(tetrametil-1,1,3,3-butyl)fenílico del polietilenglicol, después de lo cual se separa el intestino delgado del líquido en el que se han disuelto las enzimas y las hormonas.

Se designan por ácidos cólicos la serie de ácidos biliares que comprende el ácido cólico de fórmula $C_{24}H_{40}O_5$ ó su derivado el ácido desoxicólico, y los compuestos resultantes de la combinación del ácido cólico con los ácidos aminados, por ejemplo el ácido glicocólico $C_{26}H_{43}O_6N$ ó el ácido taurocólico $C_{26}H_{45}O_7SN$.

15

20

El éter mono-para-(tetrametil-1,1,3,3-butyl)fenílico del polietilenglicol, es conocido más generalmente bajo su denominación TRITON X 100 (marca registrada de la Sociedad MERCK) como agente humectante.

El empleo conjugado de los dos productos

25

citados en solución en agua para la extracción de las enzimas y de las hormonas presenta efectos inesperados. Se ha comprobado, en efecto, que estos dos productos poseían propiedades físicas complementarias y que su acción de extracción estaba ampliada notablemente por la facultad de que está dotado el éter previamente citado de extraer enzimas fijadas en las vellosidades del intestino o contenidas en el interior de las células de la pared intestinal.

Los ácidos cólicos y el éter precitado presentan igualmente la ventaja de no reaccionar químicamente con las enzimas y las hormonas del intestino.

El procedimiento según la invención permite así una puesta en solución y por consiguiente una extracción prácticamente total de las enzimas y de las hormonas. Se puede utilizar la solución como tal, o hacerla sufrir un tratamiento de purificación por diálisis y luego un tratamiento de liofilización, con vistas a la obtención de un polvo de extracto seco.

La proporción de solución acuosa con relación al peso del intestino tratado puede variar entre amplios límites, por ejemplo entre 1 y 2,5 litros de solución por kg de intestino. Sin embargo; se utilizará con preferencia la relación de 1 litro de solución para 1 kg de intestino, a fin de no tener que eliminar una

cantidad demasiado grande de líquido.

Las cantidades de ácidos cólicos y de éter mono-para-(tetrametil-1,1,3,3-butil)fenílico del polietilenglicol disueltas en el agua pueden variar dentro de los límites comprendidos entre 100 y 600 g para el primer compuesto y entre 50 y 400 ml para el segundo, referidas a 100 litros de agua.

Con preferencia, antes de poner el intestino delgado en presencia de la solución acuosa que contiene los compuestos anteriormente citados, se corta aquél en trozos para facilitar la extracción de las enzimas y de las hormonas, pero sin trituración ulterior, dado que esto último haría desaparecer una parte importante de la actividad enzimática y hormonal.

Con preferencia asimismo, después de haber puesto el intestino en presencia de la solución de extracción, se regula el pH de la mezcla obtenida a un valor comprendido entre 6 y 7. En efecto, se ha podido comprobar que por debajo de pH 6 (particularmente a partir de pH 5), se inactivaba la enteroquinasa. De igual modo, por encima de pH 7, se presentan riesgos de autodigestión de las proteínas y en particular de degradación de las enzimas.

La extracción se efectúa con preferencia a la temperatura ambiente bajo agitación durante dos ho-

ras, después de lo cual se deja la mezcla en reposo durante doce horas a una temperatura comprendida entre 0°C y 5°C. Después de la extracción, es ventajoso filtrar la mezcla sobre una tela gruesa para separar los trozos más gruesos, y centrifugar luego el filtrado.

La descripción del ejemplo indicado a título no limitante a continuación, tiene únicamente por objeto ilustrar la puesta en práctica del procedimiento de la invención.

En este ejemplo, se utilizan 100 kg de intestino delgado de cerdo congelados a -20°C y almacenados a esta temperatura hasta el momento de la extracción. Después de haber llevado la temperatura del intestino a aproximadamente 0°C, se corta el mismo con la máquina de picar carne y se toma de nuevo en 100 l de agua que contienen 100 cm³ de TRITON X 100 y 200 g de ácidos cólicos. Se ajusta el pH a un valor entre 6 y 7 y se deja en primer lugar en agitación durante dos horas, y luego en reposo durante una noche a 0°C. Se filtra el todo y se centrifuga el filtrado recogido. El residuo se agota por lavado con 20 l de agua. Los líquidos reunidos se filtran de nuevo y se concentran después por paso a través de columnas del tipo de "diálisis inversa" constituidas por discos porosos que permiten el paso de las moléculas de peso molecular inferior a 1000 aproximadamente. El volumen inicial

de líquido, que está comprendido entre 200 y 250 l, se reduce por concentración a aproximadamente 30 l. Por diálisis a través de la columna citada, se pierde, con el agua que se elimina, aproximadamente el 40% de la ma
5 teria seca inicial.

Se analiza el líquido concentrado, y se comprueba la presencia de todas las enzimas y hormonas activas. Después del paso del líquido por un dializador, se somete el líquido a la liofilización. Se obtienen así
10 4 kg de polvo seco liofilizado que se pone fácilmente en solución.

Se procede al análisis del complejo enzimático y hormonal según los métodos siguientes.

15 ENZIMAS

Se valoran las unidades de enteroquinasa según el método de KUNITZ (Methods in Enzimology, COLO-WICK-KAPLAN, nº 2, pág. 32), que consiste en una activa-
20 ción del tripsinógeno en tripsina por la enteroquinasa, definiéndose una cantidad de enteroquinasa como la canti
dad que activa 0,065 mg de tripsinógeno a pH 5,8 a 52C y durante una hora.

La dosificación de fosfatasa alcalina se
25 efectúa según el método de O.A. BESSEY, H. LOWRY y M.J.

BROCK ("DIVISION OF NUTRITION AND PHYSIOLOGY; PUBLIC HEALTH RESEARCH INSTITUTE OF NEW YORK"), publicado el 28 de marzo de 1946.

5 Los métodos indicados en "Methods in Enzymology", citado anteriormente, se utilizan para las determinaciones de maltasa (según DARLQUIST, volumen 8, página 584), lactasa, sacarasa, trehalasa y ornitin-carbamil-transferasa (volumen 17, BP 885).

10 El contenido de gamma-glutamyl-transferasa se determina según NERVILLE, y el de aminopeptidasa según G. PRONCARI y ZUBER (Inter 5 Protein AIssearch 1,45).

15 Los resultados de estas determinaciones, expresados en unidades/mg, efectuadas sobre el producto obtenido después de la realización del procedimiento según el ejemplo anteriormente citado, han sido los siguientes:

	Enteroquinasa	8 u/mg
	Maltasa	110 u/mg
	Trehalasa	2,4 u/g
20	Fosfatasa alcalina	25 u/g
	Aminopeptidasa	12 u/g
	Glutamyl-transferasa	0,5 u/g

Ornitin-carbamil-transferasa, sacarasa y lactasa, en cantidades apreciables.

25 Estas cantidades varían, bien entendido,

8.11.75

de un ensayo a otro, y sobre todo con la cantidad de ácidos cólicos y de TRITON X 100 utilizada.

5 Los ensayos efectuados han permitido, sin embargo, constatar que, en todos los casos, haciendo variar la cantidad de ácidos cólicos entre 100 y 600 g y la cantidad de TRITON X 100 entre 50 y 400 ml por cada 100 kg de intestino y 100 litros de agua, se obtenían los resultados siguientes:

10	Enteroquinasa	8 a 12 u/mg
	Maltasa	> 40 u/mg
	Fosfatasa alcalina	> 10 u/mg
	Aminopeptidasa	> 2 u/mg

HORMONAS

15 Las hormonas cuya presencia ha sido detectada en el complejo obtenido son principalmente la enterogastrona, la secretina, la colecistoquinina, la ceruleína y la pancreozimina.

20 La actividad hormonal del complejo es indudable, dado que durante la administración en terapéutica del complejo se ha podido constatar una inhibición de las contracciones intestinales.

25 Se han realizado ensayos comparativos para poner de manifiesto los resultados técnicos obteni-

dos gracias a la aplicación del procedimiento según la invención.

Las condiciones de los ensayos han sido las siguientes:

5 Se han recogido cinco lotes de cien kilogramos cada uno de intestino delgado, y se han congelado inmediatamente a -20°C . Después de un período de almacenamiento, se deja descongelar lentamente para llevar el todo a una temperatura de aproximadamente 0°C a -5°C .

10 Se cortan los lotes con cuchillo eléctrico. Se preparan cinco medios de extracción de cien litros de agua cada uno. Excepto para el primer baño de extracción, que está constituido por agua pura, se disuelven en los cuatro baños restantes las cantidades de productos indicadas a continuación.

15 Los resultados obtenidos se expresan en unidades por miligramo, mientras que la cantidad de extracto seco está indicada en porcentaje referido a la cantidad de materia prima empleada.

25

8.11.75

5

	Agua solamente	Acido cólico solamente, 600 g/100 kg de intestinos	TRITON solamente, 400 ml/100 kg de intestinos	Ensayos de acuerdo con la invención	
				Acido cólico, 200 g; TRITON, 100 ml/100 kg de intestinos	Acido cólico, 600 g; TRITON, 300 ml/100 kg de intestinos
extracto seco obtenido	2%	3%	4%	6%	6%
enteroquinasa	1 u	3 u	3 u	5 u	5 u
fosfatasa alcalina	10 u	10 u	15 u	20 u	20 u
amino-peptidasa	5 u	5 u	10 u	12 u	12 u

10

15

20

Se comprueba, por tanto, que el rendimiento de extracción es netamente más alto en el caso del empleo de la solución de extracción conforme al procedimiento de la invención, tanto en lo que concierne a la importancia de la materia extraída como a la concentración en unidades de enzima. Se observa igualmente, que la utilización de contenidos de ácidos cólicos superiores a 200 g y de contenidos de TRITON X 100 superiores a 100 ml por 100 kg de intestinos, no conduce a mejores resultados,

25

El líquido obtenido después de la extracción se filtra una vez más sobre tela y se concentra luego por paso a través de columnas de diálisis provistas de discos que permiten el paso de las moléculas de peso molecular in

ferior a 1000 aproximadamente.

Se preparan así en gran parte las sales, el TRITON X 100 y productos de degradación. Se termina con una diálisis y una liofilización.

5 La presente solicitud que corresponde a la presentada en Gran Bretaña, el 29 de Noviembre de 1974, bajo el Nº 51.853/74 (Provisional), se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

15

REIVINDICACIONES

20

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

25

1ª.- Un procedimiento de preparación de un complejo enzimático y hormonal estable a partir del

8.11.75

intestino delgado, caracterizado por el hecho de que se pone en presencia del intestino delgado fresco o conservado por el frío una solución acuosa de ácidos cólicos y de éter mono-para-(tetrametil-1,1,3,3-butil)fenílico del polietilenglicol, y después se separa el intestino delgado del líquido en el cual se han disuelto las enzimas y las hormonas.

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado por el hecho de que el líquido de extracción se purifica por diálisis y se somete luego a una liofilización con vistas a la obtención de un polvo seco.

3ª.- Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1ª ó 2ª, caracterizado por el hecho de que la proporción de solución acuosa utilizada está comprendida entre 1 y 2,5 litros por kg de intestinos.

4ª.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, caracterizado por el hecho de que la solución acuosa contiene por cada 100 litros de agua una cantidad de ácidos cólicos comprendida entre 100 y 600 g y una cantidad de éter mono-para-(tetrametil-1,1,3,3-butil)fenílico comprendida entre 50 y 400 ml.

5ª.- Un procedimiento de acuerdo con una

5 cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracteriza
do por el hecho de que 100 kg de intestino delgado se
ponen en presencia de 100 litros de agua que contienen
200 g de ácidos cólicos y 100 ml de éter mono-para-(te-
trametil-1,1,3,3-butil)fenílico.

6ª.- UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE
UN COMPLEJO ENZIMATICO"

Tal y como se ha descrito en la Memoria
que antecede y para los fines que se han especificado.

10 Esta Memoria consta de quince hojas es-
critas a máquina por una sola cara.

Madrid, 14 NOV. 1975

15

P.A. Fernando de Zizaburu
Por Poder. *[Firma]*

20

25

8.11.75

JMM/.