



MINISTERIE VAN ECONOMISCHE ZAKEN

PUBLIKATIENUMMER : 1003298A3

INDIENINGSNUMMER : 9000044

Internat. klassif.: C12S C12P C07K

Datum van verlening : 18 Februari 1992

De Minister van Economische Zaken,

Gelet op de wet van 28 Maart 1984 op de uitvindingsoctrooien inzonderheid artikel 22;

Gelet op het Koninklijk Besluit van 2 December 1986, betreffende het aanvragen, verlenen en in stand houden van uitvindingsoctrooien, inzonderheid artikel 28;

Gelet op het proces-verbaal opgesteld door de Dienst voor Industriële Eigendom op 12 Januari 1990 te 14u15

BESLUIT :

ARTIKEL 1.- Er wordt toegekend aan : TESSENDERLO CHEMIE N.V.
Stationsstraat, 3980 TESSENDERLO(BELGIE)

vertegenwoordigd door : VANDERPERRE Robert, BUREAU VANDER HAEGHEN, Colonel
Bourgstraat 108A,- B 1040 BRUSSEL.

een uitvindingsoctrooi voor de duur van 20 jaar, onder voorbehoud van de betaling van de jaartaksen voor : WERKWIJZE VOOR HET BEREIDEN VAN EEN ENZYMATISCH HYDROLYSAAT.

UITVINDER(S) : Bressollier Philippe R., rue Camille Jullian 16, 87000 Limoges (FR); Julien Raymond A., Avenue Baudin 65, 87000 Limoges (FR); Pejoan Claude H., Chabanne, 87240 Saint Sylvestre (FR); Verneuil Bernard G., Les Levades, 87430 Verneuil sur Vienne (FR); Loosen Pierre C., Russelenberg 34, 3980 Tessengerlo (BE)

ARTIKEL 2.- Dit octrooi is toegekend zonder voorafgaand onderzoek van zijn octrooieerbaarheid, zonder waarborg voor zijn waarde of van juistheid van de beschrijving der uitvindingen en op eigen risico van de aanvrager(s).

Brussel, 18 Februari 1992
BIJ SPECIALE MACHTIGING :

WERKWIJZE VOOR HET BEREIDEN VAN EEN ENZYMATISCH
HYDROLYSAAT

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het bereiden van een enzymatisch hydrolysaat, dat di- en tripeptiden bevat, uitgaande van een mengsel van dierlijke proteïnen met behulp
5 van proteolytische enzymen.

Het fysiologisch belang van de darmabsorptie van de di- en tripeptiden is ongeveer dertien jaar geleden ontdekt geweest. Aldus, het bestaan van de
10 darmtransportsystemen van kleine peptiden, verschillend van die van de vrije aminozuren, en de grootste efficiëntie van de absorptie als de voedingsaanvoer van proteïnen geschiedt met mengsels verrijkt met kleine peptiden werden aangetoond door SLEISENGER et
15 al in een artikel getiteld "Evidence for a single common carrier of uptake of a dipeptide and tripeptide by hamster jejunum in vitro" gepubliceerd in het tijdschrift "Gastroenterology", volume 71, blz. 76 tot 81 (1976).

20 Samenstellingen die rijk zijn aan di- en tripeptiden zijn van groot belang in de dieetleer niet alleen voor de voeding van jonge kinderen, herstellenden en anemiepatiënten, maar ook voor die
25 van zieken waarvan de darmabsorptie gewijzigd is, zoals bij de ziekte van Hartnup of bij cystinurie.

Zowel bij de personen die aangetast zijn door de ziekte van Hartnup als bij diegenen die aangetast

zijn door cystinurie, worden de aminozuren op een normale wijze geabsorbeerd door de darmmucose als ze onder de vorm van dipeptiden voorkomen. (Zie ASATOOR, A.M. HARRISON, B.D.W., MILNE, M.D. and PROSSER, D.1
5 (1972). Intestinal absorption of arginine-containing peptide in cystinuria Gut (Journal of the British Society for Gastroentology) volume 13, blz. 95-98 (1970) en NAYAB, F. and ASATOOR, A.M. (1970). Studies on intestinal absorption of amino acids and a
10 dipeptide in a case of Hartnup disease. Gut (Journal of the British Society for Gastroentology) volume 11, blz. 373-379 (1972).

De uitvinding vindt ook zijn toepassing in de
15 ziekenhuissector, meer bepaald in de kunstmatige voeding die toegediend wordt via orale, enterale of parenterale weg, in het bijzonder via een intraveineuse infusie.

De kunstmatige voeding ligt voor de hand bij
20 patiënten die onbekwaam zijn om zich via de normale weg te voeden wegens een lichamenlijk letsel veroorzaakt door een ongeval, een chirurgische operatie, een slokdarmtrauma of wegens een algemene
25 fysiologische toestand die geen normale voeding toelaat (coma, brandwonden).

Andere mogelijke toepassingen zijn de
immunostimulatie of het gebruik in de dierlijke
30 voeding, vooral in de visvoeding, of de aanwending als groeistimulator.

Men kent verscheidene methodes om mengsels
van peptiden of om samenstellingen rijk aan di- en
35 tripeptiden te bereiden nl. de alkalische of zure

hydrolyse, de enzymatische hydrolyse en de chemische synthese.

De alkalische hydrolyse of de zure hydrolyse
5 van eiwitten zoals lactalbumine, ovalbumine, lactoserum en caseïne met behulp van sterke zuren of basen wordt bij hoge temperatuur gebruikt om de chemische bindingen te breken. De hydrolyse leidt tot de produktie van mengsels aanzienlijk verrijkt
10 aan vrije aminozuren en dikwijls erg gecontamineerd door zouten (Cl^- , Na^+) die moeilijk te verwijderen zijn.

De gekende chemische methodes zijn gemakke-
15 lijk aan te wenden en laten toe om een hoge graad van hydrolyse te bekomen door splitsing van een groot aantal peptidebindingen. Zij zijn echter drastisch en brengen de vorming van secundaire, ongewenste reakties met zich mee evenals een vermindering van de
20 voedingswaarde van de proteïnen door de ontbinding van de essentiële aminozuren.

Aldus brengt de alkalische hydrolyse op een hoge temperatuur (100 tot 110°C) dikwijls de vorming
25 van lysinoalanine, een zeer toxisch bijprodukt, voort. Daarenboven is het moeilijk om de hydrolysegraad te controleren van het eindprodukt, dikwijls erg gecontamineerd door zouten (Cl^- , Na^+ ..).

Het dokument EP-A-0148072 beschrijft een
30 proces van proteolyse van plasmatisch eiwit voor de produktie van eiwithydrolysaten die geschikt zijn voor de menselijke en de dierlijke voeding dankzij hun aanvaardbaar aroma en smaak. In dit proces wordt
35 het bloedplasma, dat gebruikt wordt als substraat

voor de hydrolyse, verkregen door het centrifugeren van het gehele bloed opgevangen bij de slachting en met anticoagulens behandeld. Door centrifuge in een scheidingstoestel verkrijgt men een lichtgeel gekleurde fase, het plasma, en een dieprood gekleurde fase, de bloedcellen.

Men verwezenlijkt eerst een denaturatie van het plasma door een thermische behandeling van de eiwitten bij een temperatuur van 70 tot 100°C, waarbij de pH constant wordt gehouden tussen 5 tot 7 gedurende minder dan 30 minuten.

Vervolgens voert men de plasmatische eiwitproteolyse uit door het plasma toe te voegen aan een waterig reaktiemilieu dat thermolysine bevat in aanwezigheid van calciumionen met een pH van 5 tot 7 en bij een temperatuur kleiner of gelijk aan 80°C.

Bij een temperatuursbereik gelegen tussen 50 en 60°C vermijdt men de vermenigvuldiging van mesofiele bacteriën.

De aanwending van de ultrafiltratietechniek is noodzakelijk bij het proces om het enzyme en de plasmatische eiwitten tegen te houden. Men recupereert het hydrolysaat in het permeaat van de ultrafiltratie en men circuleert opnieuw het retentaat naar de reactor.

De oordeelkundige keuze van enzymen en hydrolysevoorwaarden leidt tot het verkrijgen van peptiden met welbepaalde grootte volgens de behoeften.

Het nadeel van de proteolyse in het algemeen ligt in de lage gewichtsopbrengst van di- en tripeptiden. De peptiden met meer dan drie aminozuren hebben de kinetische voordelen niet van de absorptie die hogervermeld beschreven werd.

Deze uitvinding betreft een werkwijze om een enzymatisch hydrolysaat te bereiden dat di- en tripeptiden bevat uitgaande van een mengsel van dierlijke eiwitten in aanwezigheid van proteolytische enzymen. Deze werkwijze is hoofdzakelijk gekenmerkt door het oorspronkelijk eiwitmengsel voor te bereiden door thermocoagulatie en een scheiding vloeistof-neerslag. Men laat dit voorbereid mengsel een enzymatische hydrolyse ondergaan om op die manier meer dan 50 % aan gewicht van eiwitten om te zetten in di- en tripeptiden; men extraheert het hydrolysaat door middel van een scheiding vloeistof-vaste stof om het daarna te verrijken aan di- en tripeptiden door ultrafiltratie alvorens het te steriliseren en te drogen.

In een bijzondere werkwijze voor de uitvoering van het proces, voegt men aan het dierlijk bloed minder dan 4 g/l anticoagulens toe; men centrifugeert het om zo een produkt te verkrijgen dat langer bruikbaar of geschikt is voor bewaring na bevriezing of na sproei-droging. Dit verkregen bloedplasma wordt na aanzuren thermisch behandeld binnen een temperatuursbereik gelegen tussen 70 tot 80° Celsius gedurende 30 tot 45 minuten. Vervolgens wordt het onderworpen aan een vloeistof-vaste stof scheiding door tangentiële microfiltratie, centrifugatie, filtratie onder druk of onderdruk (bij voorkeur op een persfilter), om op die manier een

vast substraat te bekomen. Dit substraat wordt in suspensie gebracht en onderworpen aan een hydrolyse met proteolytische enzymen.

5 Men gebruikt als anticoagulens kalium- of natriumoxalaat, citraat of polyfosfaat.

10 Het gewichtsrendement van di- en tripeptiden is ongeveer 18 tot 19 % ten opzichte van de gedroogde materie van het slachtingsbloed en 50 tot 56 % ten opzichte van de droge materie van het plasma.

15 Deze bijzonderheden en andere bijzonderheden en details van de uitvinding zullen worden toegelicht in de volgende gedetailleerde beschrijving.

20 Het bloed bestaat uit een vloeistof, het plasma, in hetwelk typische elementen voorkomen, zoals rode bloedlichamen of hemacyten, leukocyten of witte bloedlichamen en de bloedplaatjes. Na toevoeging van het anticoagulens laat de centrifugatie toe om enerzijds het plasma (60 tot 65 % in volume), anderzijds de typische elementen die de cruor samenstellen (35 tot 40 % in volume) op te vangen.

25 Het dierlijk bloedplasma bevat per liter 50 tot 75 g eiwitten terwijl melk er slechts 35 g bevat.

30 De eiwitten zijn in hoofdzaak albumine (45 tot 50 % in gewicht) en de globulinen. Het plasma bevat ook vetten, suikers, aminozuren en minerale zouten in oplossing. De tabel hieronder laat toe de samenstelling van het bloedserum (gedefibrineerd plasma) met dat van melk (tabel 1) te vergelijken.

TABEL 1

VERGELIJKENDE SAMENSTELLINGEN VAN SERUM EN VAN MELK

	PER LITER	BLOEDSERUM	MELK
5			
	Protiden	70 tot 80 g	34 g
	Lipiden	5 tot 6 g	35 g
10	Gluciden	1 g	49 g
	Minerale zouten	8 tot 9 g	9 g
	Andere substanties	2 tot 3 g	sporen
	Totale droge materie	86 tot 99 g	127 g

15 Het proces voor de bereiding van een samenstelling volgens de uitvinding uitgaande van slachtingsbloed, bevat de volgende vier essentiële stappen :

- 20
1. het voorbereiden van het dierlijk bloedplasma
 2. de enzymatische hydrolyse
 3. de extractie en de zuivering van een fraktie, rijk aan di- en tripeptiden
 - 25 4. de sterilisatie en de droging van het mengsel van di- en tripeptiden.

1. DE VOORBEREIDING VAN HET DIERLIJK BLOEDPLASMA

30 Het totale slachtingsbloed wordt opgevangen in aanwezigheid van anticoagulens in het slachthuis. Men voegt hoogstens 4 g/l kalium- of natriumoxalaat, citraat of polyfosfaat toe. Dit bloed wordt vervolgens gecentrifugeerd.

Het aldus bekomen plasma wordt hetzij onmiddellijk gebruikt, hetzij onmiddellijk ingevroren of gedroogd om het te bewaren met het oog op een later gebruik.

5

De aminozuursamenstelling van rundsplasma is weergegeven in tabel 2.

TABEL 2

AMINOZUURSAMENSTELLING VAN THERMO-GECOAGULEERD
RUNDSPLASMA

5		
	AMINOZUREN	
	RUNDSPLASMA	
	mol %	
10	Arginine	4,2
	Histidine	niet bepaald
	Lysine	7,9
	Tyrosine	3,1
	Tryptofaan	niet bepaald
15	Fenylalanine	6,8
	Cysteïne	2,2
	Methionine	0,8
	Threonine	7,2
	Serine	8,8
20	Leucine	8,6
	Isoleucine	2,8
	Valine	7,2
	Glutamine-zuur	10,5
	Asparagine-zuur	8,8
25	Glycine	5,9
	Alanine	6,8
	Proline	6,0

De aminozuursamenstelling van de plasma-eiwitten is gelijkend op die van eiwitten die beschouwd worden evenwichtig te zijn zoals die van melk of van het ei.

5

In het bijzonder, de essentiële aminozuren zoals fenylalanine, lysine, threonine, leucine en valine zijn er vertegenwoordigd in behoorlijke proporties.

10

Het in oplossing gebrachte ingevroren of geatomisserde plasma aan een concentratie van ongeveer 70 g/l (N x 6,25), wordt op een pH beneden 6 gesteld en op een temperatuur boven 65° Celsius gebracht. De voorwaarden die leiden tot een maximale neerslag van de plasmatische eiwitten worden weerhouden.

15

Na het verlagen van de pH van het dierlijk plasma tussen 4,5 en 5 door middel van een sterk voedingstoegelaten zuur (HCl, H₂SO₄, of bij voorkeur H₃PO₄ 4 tot 6 N) wordt de temperatuur van de eiwitoplossing verhoogd tot 70° Celsius binnen een tijdsinterval dat 30 minuten niet overschrijdt. Men houdt deze temperatuur gedurende 30 minuten constant en nadien koelt men snel (5 tot 10 minuten) af tot ongeveer 20° Celsius. Vervolgens recupereert men 95 % aan gewicht van het eiwitstikstof onder de vorm van een coagulaat waarvan de gemiddelde inhoud aan proteïnen 160 tot 220 g/kg bedraagt.

20

25

Bij het verlagen van de pH van het dierlijk plasma, gebruikt men meestal fosforzuur omdat de fosfaationen de eigenschap hebben om een onoplosbare neerslag te vormen met bivalente kationen nl. diegene

30

35

aangebracht door de basen (Ca(OH)_2) die gebruikt worden bij de enzymatische hydrolyse.

Op die manier is het mogelijk het calciumgehalte in het eindproduct op een beduidende manier te verlagen, dankzij het gebruik van fosforzuur tijdens de bereiding van het substraat bij de voorafgaande stap. De noodzakelijke thermische overgangen voor een optimale thermocoagulatie zijn weergegeven in de grafiek figuur 1.

Na thermische behandeling wordt het bloedplasma onderworpen aan een vloeistof-vaste stof scheiding.

De vloeistof-vaste stof scheiding wordt verwezenlijkt door tangentiële microfiltratie, centrifugatie of filtratie op persfilter. Heden geeft de filtratie op persfilter met platen de beste resultaten.

Deze thermische behandeling gevolgd door een vloeistofvaste stof scheiding geeft de volgende voordelen :

- 25 - verhoging van de toegankelijkheid van het substraat tot het enzyme;
- vernietiging van het grootste deel van de protease-inhibitoren;
- 30 - betekenisvolle verlaging van de besmettelijke mesofiele flora;
- uitschakeling van vrije aminozuren en andere kleine niet-proteïne-molekullen (vetten, suikers, ureum...); en

- vermindering van de ionische kracht van de eiwitsubstraatoplossing na uitschakeling van de ionen tijdens de vloeistof-vaste stof scheiding door filtratie of centrifugatie.

5

Het proteïne-coagulaat, gedeeltelijk ontzout, wordt onmiddellijk gebruikt in een enzymatische reaktor of bewaard in de diepvriezer bij -20° Celsius.

10

2. ENZYMATISCHE HYDROLYSE

A. De keuze van het enzyme (protease)

De hydrolyse reactie gebeurt optimaal voor elke protease dat toelaat een oplosbaarheidsgehalte van plasmapeptiden van meer dan 90 % te bekomen in een zuur milieu (de verhouding van zuur oplosbare eiwitten in trichloor azijnzuur van 100 g/l op totaal aan eiwitten onderworpen aan hydrolyse) evenals een inhoud aan di- en tripeptiden van minstens 75 % van het totaal aan aminozuren.

20

De meest geschikte proteasen zijn deze van het type serine-proteïnase, de alkalische proteinasen en die afkomstig van *Bacillus licheniformis* waarvan het subtilisine van Carlsberg (EC 3. 4. 4. 16) het hoofdbestanddeel is.

25

Bij wijze van voorbeeld, kunnen de industriële proteolytische enzymen Alkalase 2, 4, 1 (NOVO R) of Pescalase 560 (GIST BROCADES R) gekozen worden.

30

De hydrolyse reactie van het rundsplasma met Alkalase R (NOVO) of Pescalase R (GIST BROCADES) geschiedt optimaal bij pH-waarden tussen 7 en 9, bij voorkeur tussen 7,0 en 7,5.

5 Bovendien zijn bij deze pH-waarden, die dicht bij de neutrale waarde liggen, de hoeveelheden base, noodzakelijk voor het behoud van de pH gedurende de proteolyse ronduit minder belangrijk dan
10 bij alkalische pH (8 tot 9). Deze opmerking is zeker niet te verwaarlozen in de mate dat de verwijdering van de ionen, op het einde van het proces, moeilijk is.

15 Bij de hydrolyse reactie kunnen de gebruikte basen voor het behoud van de pH zeer verscheiden zijn (KOH, Ca(OH)_2 , NaOH enz...). Teneinde de ionische sterkte in het produkt voortvloeiend uit de hydrolyse te beperken, zal voor de controle en het behoud van
20 de pH, kalk (Ca(OH)_2) gewoonlijk als base gekozen worden.

De meest geschikte reaktietemperaturen liggen tussen 50 tot 60° Celsius, om op die manier de
25 proteolyse snel te laten gebeuren en de denaturatie van het enzyme zo miniem mogelijk te houden.

Echter, de keuze van een temperatuur van 60° Celsius laat toe de reaktietijd te verlagen (5 uren
30 in plaats van 9 uren aan 50° Celsius) en de vermenigvuldiging van de bacteriën op een betekenisvolle manier te beperken tijdens de hydrolyse.

De combinatie van een neutrale pH, of dicht
35 bij de neutrale waarde (7 tot 7,5) en van een

temperatuur tussen 50 tot 60° Celsius laat toe een
 gehalte hoger dan 90 % aan oplosbare plasmatische
 eiwitten in zuur milieu en een gehalte van tenminste
 75 % aan di- en tripeptiden te bekomen bij
 5 reaktietijden variërend tussen 5 tot 9 uren en dit
 wanneer de proteasen die gebruikt worden hetzij
 Alcalase R (NOVO), hetzij Pescalase R (GIST BROCADES)
 zijn.

10 De gewichtsverhouding is bepaald door de
 volgende vergelijking :

$$\begin{array}{r}
 \text{Massa enzyme} \\
 \text{-----} \\
 \text{15 Massa eiwitsubstraat}
 \end{array}
 \times 100 = \frac{\text{E}}{\text{S}} \text{ in \%}$$

waarbij de enzyme massa gelijk is aan de massa
 industriële bereiding van Alcalase of Pescalase die
 toegevoegd wordt aan het reaktiemilieu.

20 De substraatmassa is gelijk aan de massa van de
 plasmatische eiwitten toegevoegd aan de reaktor. Zij
 wordt gemeten met de Kjeldhal methode (hoeveelheid
 elementaire stikstof x 6,25).

25 De gewichtsverhouding van de respectievelijke
 concentraties aan enzymen en aan eiwitsubstraat is
 tussen 1 tot 4 %.

30 Daarenboven moet de concentratie aan
 eiwitsubstraat in de reaktor zo hoog mogelijk zijn,
 maar eveneens een goede homogeneïteit van het milieu
 waarborgen.

35 Bij wijze van voorbeeld, een verhouding E/S
 van 2 % en een concentratie aan substraat van

ongeveer 90 g/l lijken optimaal.

B. De vernietiging van het enzyme

5 Wanneer de proteolysereactie beschouwd wordt als afgelopen, gaat men over tot de vernietiging van het enzyme door de pH te verlagen tot 5,5 à 6,5 door toevoeging van een voedingstoegelaten sterk zuur (HCl, H₂SO₄, H₃PO₄...) bij voorkeur H₃PO₄.

10 De combinatie van een pH-verlaging van het milieu met een temperatuursverhoging is de beste.

15 Men verhoogt de temperatuur zeer snel (in 10 tot 20 minuten) tot 75 - 80° Celsius, daarna behoudt men deze temperatuur gedurende 5 tot 30 minuten. Na deze thermische behandeling, wordt de temperatuur van het milieu zeer snel verlaagd tot 15 - 20° Celsius.

20 Bij voorkeur verlaagd men de pH tot 6,5 en behoudt men gedurende 20 minuten een temperatuur van 80° Celsius. De bijzondere werkcondities laten een complete vernietiging van het protease toe zonder dat enig spoor van activiteit ontdekt wordt door de referentietesten, terwijl de vorming van toxische derivaten zoals lysinoalanine vermeden wordt.

3. ZUIVERING VAN HET HYDROLYSAAT RIJK AAN DI- EN TRIPEPTIDEN

30 A. Het klaren

35 Na de enzymatische hydrolyse van het dierlijk plasma, onderwerpt men het reaktiemilieu aan een klaring hetzij door centrifugatie hetzij door

filtratie (tangentiële microfiltratie, filtratie op persfilter...), teneinde de onoplosbare eiwitresten, alsook de plasmatische lipidedeeltjes en het mineraal neerslag zoals de calciumfosfaten te verwijderen.

5

Men gebruikt bv. een persfilter met platen in aanwezigheid van filtratiehulpmiddelen van het type diatomite (Spendalite N) aan een concentratie van 30 tot 50 g/kg.

10

B. Ultrafiltratie

Het door filtratie geklaard hydrolysaat wordt onderworpen aan ultrafiltratie door middel van organische membranen (Polysulfone) opgesteld volgens holle vezels (Amicon^R), als vlakken (Millipore^R) of spiralen (Millipore^R-Amicon^R) of door middel van minerale membranen (keramische) opgesteld volgens multikanalen (Tech Sep). De eiwitfractie, opgevangen in de ultrafiltratie, bevat de verrijkte samenstelling aan di- en tripeptiden. Het filtratiebereik van de membranen moet tussen de 1.000 tot 10.000 liggen.

20

4. STERILISERENDE FILTRATIE EN DROGEN VAN DE SAMENSTELLING RIJK AAN DI- EN TRIPEPTIDEN (DTP)

25

Het mengsel rijk aan di- en tripeptiden bekomen door ultrafiltratie, wordt in een zo kort mogelijke termijn (de bewaring in de koelkast aan 4° Celsius mag de 24 uren niet overschrijden) onderworpen aan een steriliserende filtratie met als doel al de besmettelijke bacteriën uit het mengsel te verwijderen.

30

Daartoe mogen de filtreringsystemen van het type Millipore, Sartorius...gebruikt worden.

Daar de filtratie-eigenschappen van het
5 produkt zeer goed zijn, is het filtersysteem eenvoudig :

- een voorfilter van 2 tot 0,65 micron
- een totale filter van 0,22 micron.

10 Het gefiltreerd produkt wordt opgevangen in een steriel vat vooraleer het onderworpen wordt aan een deshydratie; het water kan verwijderd worden hetzij door lyofilisatie hetzij door atomisatie al of
15 niet gekoppeld aan een preconcentratie door vacuüm-indamping.

Bijvoorbeeld, het verrijkte mengsel aan di-
en tripeptiden met aanvankelijk 8 % aan droge
20 materie, wordt dor atomisatie op NIRO ATOMIZER, type kleine produktie, gedroogd waarbij het voedingsdebiet gefixeerd is op 12 l per uur en de ingangstemperatuur 180 ° Celsius is en de uitgangstemperatuur geregeld wordt op 80 ° Celsius. De droge materie van het
25 verkregen poeder is 94 tot 96 %.

De scheiding en de telling van de peptiden op basis van het aantal residuele bestandsaminozuren hetgeen onvermijdelijk een moeilijk op te lossen
30 probleem is, werd opgelost door het gebruik van een recente techniek "Ligand exchange-high performance liquid chromatography" (LE-HPLC).

De gelpermeatie chromatografie is een
35 techniek waarbij men molekulen scheidt op basis van

hun moleculaire grootte. De kleine peptiden worden echter met deze techniek niet gescheiden op basis van hun massa, omdat de elutiezones van di- en tripeptides met verschillende massa's overlappen, 5 hetgeen nl. afhankelijk is van het bestaan van multipele interacties peptiden/gel. Te meer omwille van de bedekking van massadomeinen met families van verschillende afmetingen, laat de moleculaire massa-distributie niet toe om een complex mengsel aan 10 kleine peptiden te karakteriseren op basis van hun afmeting. Voor al deze redenen wordt de telling van de di- en tripeptiden in het algemeen niet correct gedaan.

15 Door het op punt te stellen van de techniek LE-HPLC op koperbedekt silicium gekoppeld aan de chemische degradatie van Edman, kon een directe dosering van de aminozuren en van de niet-basische dipeptiden en een indirecte dosering van de 20 tripeptiden uitgevoerd worden. De telling van de aminozuren van niet-basische dipeptiden * en van peptiden met grotere afmeting wordt gerealiseerd door fluorescentie spectrometrie na reductie tot aminozuren.

25 Het bekomen enzymatisch hydrolysaat doet zich voor onder de vorm van een wit poeder met zoete en aangename smaak met de volgende samenstelling :

- 30
- minimum 75 gewichts% in di- en tripeptiden
 - minder dan 5 gewichts% in vrije aminozuren, en
 - minder dan 20 gewichts% in oligo-peptiden groter dan drie aminozuren, de gemiddelde ketenlengte is ongeveer 6,2 aminozuren.

De droge materie van het verkregen poeder op het einde van de bereiding is 94 tot 96 %.

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze voor het bereiden van een enzymatisch hydrolysaat dat di- en tripeptiden bevat, uitgaande van een mengsel van dierlijke plasmatische eiwitten, met behulp van proteolytische enzymen, met
5 het kenmerk, dat men het bovengenoemd mengsel van eiwitten bereidt door thermocoagulatie en vloeistof-vaste stof scheiding; men onderwerpt dit mengsel aan een enzymatische hydrolyse om meer dan 50 % in gewicht aan eiwitten om te zetten in di- en
10 tripeptiden; men extraheert het hydrolysaat door een vloeistof-vaste stof scheiding; vervolgens verrijkt men het aan di- en tripeptiden door ultrafiltratie vooraleer het te onderwerpen aan sterilisatie en droging.
- 15
2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het bereiden van het oorspronkelijk mengsel gerealiseerd wordt door toevoeging van minder dan 4 g/l anticoagulens aan het slachtingsbloed en
20 dat het mengsel onderworpen wordt aan een centrifugatie teneinde een produkt te bekomen dat aanstonds kan gebruikt worden of dat geschikt is voor het bewaren door invriezing of droging door atomisatie; men onderwerpt het also verkregen
25 bloedplasma, na aanzuring, aan een thermische behandeling in een temperatuursinterval tussen 70 tot 80 ° Celsius gedurende 30 tot 45 minuten en vervolgens aan een vloeistof-vaste stof scheiding

door tangentiële microfiltratie of centrifugatie (bij voorkeur filtratie op persfilter met platen) om een vast substraat te bekomen dat onderworpen mag worden aan de hydrolyse in aanwezigheid van proteolytische
5 enzymen, na het terug in suspensie te hebben gebracht.

3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat het bloedplasma, bereid door thermocoagulatie om de proteolyse snelheid te verhogen, gehydrolyseerd wordt aan pH-waarden tussen 7 en 9, bij
10 voorkeur tussen 7,0 en 7,5 in aanwezigheid van subtylisine bij temperaturen gelegen tussen 50 en 60° Celsius gedurende 5 tot 9 uren.

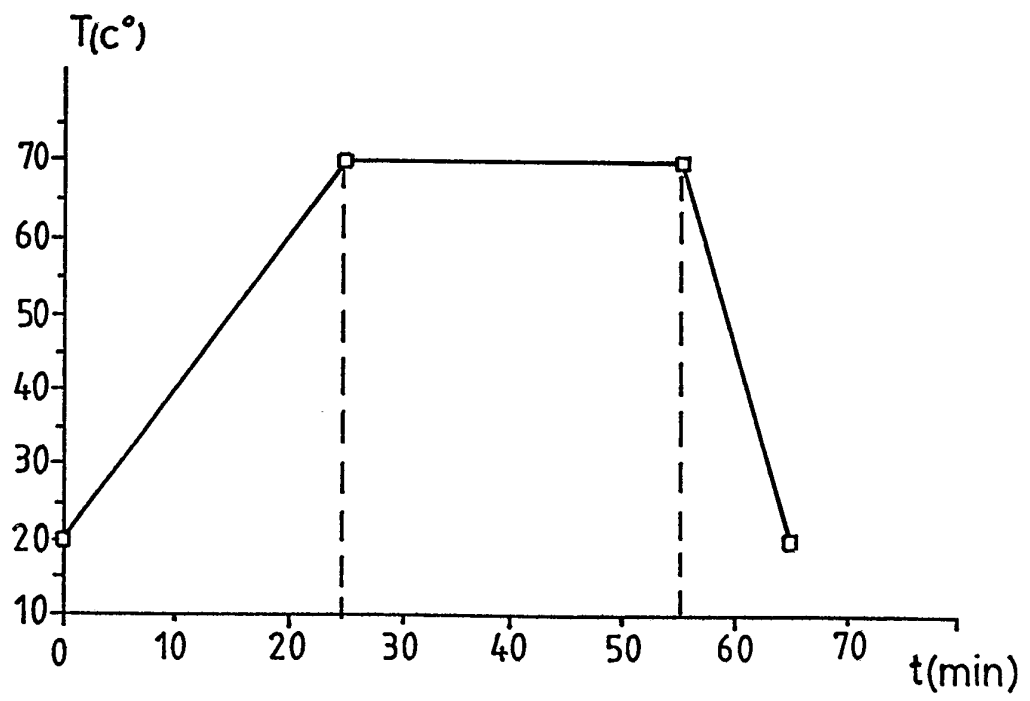
15 4. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat het anticoagulens kalium- of natriumoxalaat, citraat of polyfosfaat is.

20 5. Werkwijze volgens eender welke vorige conclusie, met het kenmerk, dat men overgaat tot de vernietiging van het enzyme wanneer de hydrolyse reactie beschouwd wordt als afgelopen, door de pH te verlagen tussen 5,5 tot 6,5 door toevoeging van een
25 sterk voedingsgeschikt zuur (HCl, H₂SO₄, H₃PO₄) bij voorkeur H₃PO₄, bij een temperatuur begrepen tussen 70 en 80° Celsius gedurende 5 tot 45 minuten.

6. Werkwijze volgens eender welke vorige
30 conclusie, met het kenmerk, dat men het eiwitmengsel, voorbereid door thermocoagulatie op drukfilter met platen, filtreert om de vrije aminozuren en andere molekulen van het niet-proteïne type met laag molekulaire gewicht (lipiden, suikers, ureum) te
35 verwijderen en een mengsel van di- en tripeptiden te

bekomen dat een laag gehalte aan vrije aminozuren heeft en een zwakke ionische sterkte.

7. Werkwijze volgens eender welke vorige
5 conclusie uitgaande van het plasma van slach-
tingsbloed, met het kenmerk, dat het zich vertoont
onder de vorm van een poederachtige witte massa met
een zoete en aangename smaak bevattend :
- ten minste 75 gewichts % aan di- en tripeptiden,
 - 10 - minder dan 5 gewichts% aan vrije aminozuren,
 - minder dan 20 gewichts% aan grotere peptiden dan
drie aminozuren en met een gemiddelde lengte van
ongeveer 6,2.





Europees
Octrooibureau

VERSLAG BETREFFENDE HET ONDERZOEK

opgesteld krachtens artikel 21 § 1 en 2
van de Belgische wet op de uitvindingsoctrooien
van 28 maart 1984

Nummer van de
nationale aanvraag:

BE 9000044
BO 2101

VAN BELANG ZIJNDE LITERATUUR			
Categorie	Vermelding van literatuur met aanduiding voor zover nodig, van speciaal van belang zijnde tekstgedeelten of tekeningen	Van belang voor conclusie(s)Nr.:	CLASSIFICATIE VAN DE AANVRAAG(Int.Cl.5)
Y	EP-A-0 274 939 (LABORATOIRE ROGER BELLON) * Conclusies 1-14; pagina 4, regels 36-56 *	1-7	C 12 S 3/22 C 12 P 21/06 C 07 K 15/00 // A 61 K 37/18 A 23 J 3/34
D,Y	EP-A-0 148 072 (ELECTRICITE DE FRANCE) * Conclusies 1-3,6,8; pagina 3, regels 7-15; pagina 6, regels 31-33 *	1-7	
A	EP-A-0 044 032 (TERUMO CORP.) * Conclusies 1-5 *	1-7	
			ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK(Int.Cl.5)
			C 12 S C 12 P C 07 K A 61 K A 23 J
Datum waarop het onderzoek werd voltooid		Vooronderzoeker	
12-10-1990		RYCKEBOSCH A.O.A.	
CATEGORIE VAN DE VERMELDE LITERATUUR			
X : op zichzelf van bijzonder belang Y : van bijzonder belang in samenhang met andere documenten van dezelfde categorie A : achtergrond van de stand van de techniek O : verwijzend naar niet op schrift gestelde stand van de techniek P : literatuur gepubliceerd tussen voorrangs- en indieningsdatum		T : niet tijdig gepubliceerde literatuur over theorie of principe ten grondslag liggend aan de uitvinding E : eerdere octrooipublicatie maar gepubliceerd op of na indieningsdatum D : in de aanvraag genoemd L : om andere redenen vermelde literatuur & : lid van dezelfde octroofamilie, corresponderende literatuur	

EOB FORM 02.83 (P0447)

**AANHANGSEL BEHORENDE BIJ HET RAPPORT BETREFFENDE
HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK,
UITGEVOERD IN DE BELGISCHE OCTROOIAANVRAGE NR. BE 9000044
BO 2101**

Het aanhangsel bevat een opgave van elders gepubliceerde octrooiaanvragen of octrooien (zogenaamde leden van dezelfde octrooifamilie), die overeenkomen met octrooischriften genoemd in het rapport.

De opgave is samengesteld aan de hand van gegevens uit het computerbestand van het Europees Octrooibureau per 18/10/90
De juistheid en volledigheid van deze opgave wordt noch door het Europees Octrooibureau, noch door de Octrooiraad gegarandeerd ; de gegevens worden verstrekt voor informatiedoeleinden.

In het rapport genoemd octrooischrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
EP-A- 0274939	20-07-88	FR-A, B 2608050	17-06-88
		JP-A- 63258559	26-10-88
EP-A- 0148072	10-07-85	FR-A, B 2557592	05-07-85
		AU-B- 581194	16-02-89
		AU-A- 3721284	18-07-85
		CA-A- 1239359	19-07-88
		JP-A- 60156344	16-08-85
EP-A- 0044032	20-01-82	JP-A, B, C 57018995	30-01-82
		JP-A, B 57018623	30-01-82
		CA-A- 1164377	27-03-84
		GB-A, B 2079758	27-01-82
		US-A- 4452888	05-06-84
		BE-A- 889532	03-11-81