

Brevet N°	<b>85479</b>	GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG
du	25 juillet 1984	
Titre délivré :	<b>12 FEV. 1986</b>	



Monsieur le Ministre  
de l'Économie et des Classes Moyennes  
Service de la Propriété Intellectuelle  
LUXEMBOURG

## Demande de Brevet d'Invention

### I. Requête

OLEOFINA S.A., 37 rue de la Science, B-1040 Bruxelles, représentée par Monsieur Jean Waxweiler, 21-25 Allée Scheffer, Luxembourg, agissant en qualité de mandataire (1)

dépose(nt) ce vingt-cinq juillet mil neuf cent quatre-vingt-quatre à 15,00 heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg : (3)

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant : Compositions antibactériennes de nourriture pour animaux et procédé pour les préparer. (4)

2. la délégation de pouvoir, datée de Bruxelles le 19 juillet 1984  
3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires;  
4. / planches de dessin, en deux exemplaires;  
5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg, le vingt-cinq juillet mil neuf cent quatre-vingt-quatre

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) : Monsieur Jean-Paul H.P. PRIEELS, 7 avenue de Février, B-1200 Bruxelles et Monsieur Jean-Paul PERRAUDIN, 30 Hoogveldlaan, B-1070 Dilbeek (5)

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de (6) / déposée(s) en (7) / le / (8)

au nom de / (9)

élit(élisent) pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg Jean Waxweiler, 21-25 Allée Scheffer, Luxembourg (10)

sollicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à 18 mois. (11)

Le mandataire

### II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du :

à 15,00 heures



Pr. le Ministre  
de l'Économie et des Classes Moyennes,  
p. d.

M E M O I R E D E S C R I P T I F  
DEPOSE A L'APPUI D'UNE DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION  
AU GRAND-DUCHE DE LUXEMBOURG

---

OLEOFINA S.A.

---

Compositions antibactériennes de nourriture pour animaux et procédé pour les préparer.

---

COMPOSITIONS ANTIBACTERIENNES DE NOURRITURE POUR  
ANIMAUX ET PROCEDE POUR LES PREPARER

---

La présente invention se rapporte à une nouvelle composition de matières alimentaires comprenant un système antibactérien en plus des éléments nutritifs eux-mêmes. En particulier, elle se rapporte à des compositions de nourriture pour animaux, qui contiennent ce système. La présente invention se rapporte également à la préparation de cette composition alimentaire ainsi qu'à son utilisation dans la production de produits pharmaceutiques contenant ce système .

La présente invention concerne une composition de nourriture pour animaux qui comprend un système antibactérien qui présente un effet efficace dans l'appareil gastro-intestinal. La présente invention se rapporte également à des compositions de nourriture pour animaux ayant un effet bénéfique sur la croissance.

Il est bien connu que les animaux domestiques et en particulier les jeunes animaux sont sujets à de sévères infections gastro-intestinales qui dépendent principalement de E. Coli ou d'autres espèces de Salmonella. On connaît évidemment des méthodes pour éliminer ces infections, soit par injection d'antibiotiques avec le risque d'une résistance à l'antibiotique, soit par vaccination, ce qui est très coûteux.

On connaît également une composition contenant de la lactoperoxydase qui permet de réduire les infections gastro-intestinales tout en autorisant un accroissement de la prise de poids, cependant on a constaté que dans les premières semaines de vie des jeunes animaux, les diarrhées sont encore relativement fréquentes.

On a également proposé d'accroître la concentration en lactoperoxydase mais, sans pour autant obtenir une diminution significative des diarrhées.

Il semble donc souhaitable de posséder un système antibactérien qui permette notamment de réduire les infections intestinales notamment au cours des premières semaines de vie des animaux, tout en permettant une amélioration de la prise de poids.

La présente invention a pour objet un tel système antibactérien ayant un effet sur les infections gastro-intestinales.

La présente invention a également pour objet une composition de nourriture pour animaux contenant ce système antibactérien.

La Demanderesse a maintenant trouvé d'une manière inattendue que la présence conjointe de lactoperoxydase et de lactoferrine avait un effet de synergie pour empêcher et/ou éliminer ces infections bactériennes, lorsque ces deux protéines étaient données dans la nourriture des jeunes animaux.

La composition alimentaire de la présente invention est caractérisée en ce qu'elle comprend en plus des matières alimentaires, un système antibactérien étant constitué par au moins de la lactoperoxydase et de la lactoferrine, du thiocyanate et un précurseur d' $H_2O_2$ .

Le procédé de la présente invention pour préparer la composition alimentaire, comprenant un système antibactérien activé dans l'appareil gastro-intestinal au moyen d'un thiocyanate et d'un précurseur d' $H_2O_2$ , est caractérisé en ce que l'on ajoute le système antibactérien à des compositions nutritives connues, ce système étant constitué par au moins de la lactoperoxydase et de la lactoferrine.

On a maintenant trouvé, que l'action conjointe de la lactoferrine et de la lactoperoxydase utilisées à raison d'environ 90 mg de mélange de ces deux enzymes par kg de composition alimentaire, donne un effet antibactérien tout à fait inattendu si l'on se réfère à l'effet que ces enzymes peuvent donner lorsqu'elles sont utilisées seules.

On a ainsi trouvé que le nombre de diarrhées était d'environ deux à trois fois moins élevé que lorsque l'on donne de la lactoferrine ou de la lactoperoxydase seule.

On a également trouvé d'une manière inattendue que l'utilisation conjointe de la lactoferrine et la lactoperoxydase dans les compositions alimentaires, avait une action bénéfique sur la prise de poids des animaux. Cet effet semble indépendant de l'action anti-diarrhéique. On a d'ailleurs constaté que ni l'une ni l'autre de ces enzymes n'avaient un effet aussi important lorsqu'elle était utilisée seule.

Les quantités de lactoferrine et de lactoperoxydase présentes dans les compositions alimentaires, peuvent varier; elles dépendent cependant de la composition alimentaire utilisée. Ainsi généralement on utilise la lactoperoxydase à raison de 2 à 10 mg/l de lactoreplaceur et de préférence de 8 à 12 mg/l; et la lactoferrine à raison de 40 à 120 mg/l et de préférence de 70 à 80 mg/l de lactoreplaceur.

La lactoperoxydase présente dans les compositions alimentaires doit être activée au moyen d'un système comprenant du thiocyanate et un précurseur d' $H_2O_2$ . Généralement, on ajoute le thiocyanate en une quantité d'au moins 16 ppm par rapport à la composition de matière alimentaire, cette quantité étant calculée comme Na SCN.

On ajoute le précurseur d' $H_2O_2$  de telle sorte qu'il produise une quantité suffisante d' $H_2O_2$  pour oxyder les 16 ppm de NaSCN. Généralement, on utilise comme précurseur d' $H_2O_2$  le système acide ascorbique et  $Cu^{2+}$ , le système glucose-glucose oxydase ou encore des peroxydes solubles dans l'eau comme les percarbonates alcalins et autres analogues.

Selon le procédé de l'invention, on ajoute le thiocyanate en une quantité de 10 à 100 mg/l de lactoreplaceur. On ajoute le thiocyanate et le précurseur d' $H_2O_2$  en une quantité telle qu'il y ait entre 10 et 100 ppm de  $OSCN^-$  produits sur une période de 30 minutes.

Les quantités indiquées ci-dessus des ingrédients sont données de manière que le thiocyanate soit en quantité telle que sa concentration dans l'appareil digestif soit d'au moins 0,1 mM et que le précurseur d' $H_2O_2$  soit présent en quantité telle que sa concentration dans l'appareil digestif exprimé comme  $H_2O_2$  soit d'au moins 0,1 mM et que le mélange lactoperoxydase et lactoferrine pris sous forme purifiée et/ou sous la forme de produit lacté contenant le mélange soit en quantité telle que sa concentration dans l'appareil digestif soit d'au moins 45 mg/litre de lactoreplaceur.

En tant que précurseur d' $H_2O_2$ , on utilise de préférence le système constitué par le glucose et la glucose oxydase. On introduit ce système à raison de 1 à 10 mg/l de glucose oxydase dans la composition alimentaire. Cependant, d'autres systèmes précurseurs d' $H_2O_2$  peuvent être utilisés comme le percarbonate de sodium et autres analogues. L'homme de métier connaît les quantités de précurseur à mettre en oeuvre pour obtenir  $H_2O_2$  en quantités désirées.

La présente invention se rapporte également à un procédé pour une production améliorée de viande comestible, selon lequel les veaux, les cochons, les moutons, les lapins, les visons reçoivent des éléments de nutrition connus en soi ainsi qu'un système antibactérien comprenant un mélange de lactoferrine et de lactoperoxydase, un thiocyanate et un précurseur d' $H_2O_2$ , le thiocyanate étant ajouté en une quantité telle que sa concentration dans l'appareil digestif soit d'au moins 0,1 mM, le précurseur de  $H_2O_2$  étant ajouté en une quantité telle que sa concentration dans l'appareil digestif calculée sous forme de  $H_2O_2$  soit d'au moins 0,1 mM, le mélange lactoferrine et lactoperoxydase étant ajouté en quantité telle que sa concentration dans l'appareil digestif soit d'au moins 45 mg/litre de lactoreplaceur.

La présente invention a également pour objet un système antibactérien caractérisé en ce qu'il comprend un mélange de lactoferrine et de lactoperoxydase, un thiocyanate et un précurseur d' $H_2O_2$ .

La présente invention a également pour objet une méthode de traitement des infections gastro-intestinales chez les mammifères, y compris l'homme, cette méthode étant caractérisée en ce que l'on administre par voie orale une quantité thérapeutiquement efficace du système antibactérien décrit ci-dessus.

La présente invention a également pour objet des préparations pharmaceutiques comprenant le système antibactérien mentionné ci-dessus; ce système peut être utilisé sur tous supports pharmaceutiquement acceptables.

A titre d'exemples d'animaux traités, on peut citer les cochons, les veaux et autres animaux domestiques comme les chats et les chiens.

Les quantités nécessaires d'activateurs de la lactoperoxydase qui peuvent être utiles dans l'appareil digestif sont bien décrites dans le brevet belge 852195.

Dans le cas de la présente invention où l'on utilise un système bactérien comprenant de la lactoferrine et de la lactoperoxydase, ces quantités restent valables.

On peut ainsi rappeler qu'en ce qui concerne la lactoperoxydase, une unité de celle-ci est la quantité de lactoperoxydase qui forme 1 mg de purogalline

en partant de purogallol en 20 secondes, à un pH égal à 6,0 et à une température de 20°C.

On rappellera également que la LD<sub>50</sub> du thiocyanate est de 484 mg/kg du poids du corps lorsqu'il est injecté par voie intraveineuse chez les souris et est de 764 mg/kg du poids du corps lorsqu'il est administré par voie orale chez le rat.

En emploi clinique, les composés selon la présente invention sont normalement administrés par voie orale, ou par voie rectale sous la forme d'une préparation pharmaceutique, qui contient un système antibactérien selon l'invention déposé sur un support pharmaceutique acceptable.

En général, la quantité d'ingrédients actifs est comprise entre 0,1 et 99% en poids de la préparation, et avantageusement entre 2 et 50% en poids dans les préparations destinées à être administrées par voie orale.

Dans la préparation de préparations pharmaceutiques contenant un système antibactérien selon la présente invention sous forme d'unités de dosage pour administration par voie orale, les ingrédients choisis peuvent être mélangés avec un support solide, pulvérulent, bien connu comme la lactose, saccharose, sorbitol, mannitol, et autres analogues.

Si l'on désire avoir des comprimés enrobés, le noyau préparé comme ci-dessus pourra être enrobé d'une solution d'un polymère qui se dissout ou est perméable dans l'appareil intestinal.

Des unités de dosage pour l'administration rectale pourront être préparées sous forme de suppositoires qui contiennent la substance active en mélange avec une base constituée par une graisse neutre, ou bien elles pourront être préparées sous forme de capsules rectales en gélatine contenant la substance active en mélange avec une huile végétale ou une huile de paraffine.

Des préparations pharmaceutiques contenant un système antibactérien selon l'invention sont destinées à être employées pour le traitement d'infections bactériennes dans l'appareil gastro-intestinal, provoquées <sup>exemple par</sup> par *Chigella*, *Salmonella*, *E. Coli*, *Vibero Colera*, *Pseudomonas* (*Ps. pyocyanea*) *Staphylococcus* (*Staph. albus*, *aureus*), *Streptococcus* (*Strep. viridans*, *Strep. faecalis*,  $\beta$ -*Streptococcus*), *Proteus*.

La présente invention sera décrite plus en détail ci-après en se reportant à des exemples, mais sans être limitée à ceux-ci.

Exemple 1

On a préparé un succédané de lait comprenant les ingrédients suivants :

- poudre de lait : 60 kg (contenant lactoferrine et lactoperoxydase)
- lactosérum : 14,15 kg
- graisse : 17 kg
- glucose : 5 kg
- Ethoxyquine : 0,125 kg
- chlorure de choline : 0,025 kg
- sels minéraux et vitamines : 2,5 kg
- emulsifiant

Les concentrations en lactoferrine et en lactoperoxydase dans la poudre de lait étaient respectivement de 61 g et 7,7 g pour 100 kg de poudre.

En tant qu'activateur de la lactoperoxydase on a ajouté 12,3 g de thiocyanate de sodium et 7,7g de glucoseoxydase (75.000 U/g)

Les ingrédients furent mélangés intimement dans un mélangeur. On a ajouté de l'eau au mélange sec pour obtenir une solution aqueuse à 13%. Cette solution contenait 10 mg de lactoperoxydase et 80 mg de lactoferrine par litre de succédané de lait.

On a administré ce mélange à des veaux, à raison de 3 l/jour la première semaine, 4 l/jour la deuxième semaine, 6 l/jour la troisième semaine et 8 l/jour à partir de la quatrième semaine.

A titre de comparaison, on a donné une même quantité d'un mélange ne contenant ni lactoferrine, ni lactoperoxydase (mélange A), d'un mélange contenant 10 mg/l de lactoperoxydase (mélange B), et d'un mélange contenant 80 mg/l de lactoferrine (mélange C).

On a déterminé l'effet antibactérien en notant le nombre de diarrhées, ainsi que l'effet nutritif en déterminant la prise de poids des veaux.

On a traité les veaux pendant une période de 5 semaines.

Les résultats sont indiqués dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1

Effet antibactérien

(Nbre de diarrhées exprimé en % si le contrôle est pris égal à 100%)

Mélange de l'invention	Mélange A (contrôle)	Mélange B lactoperoxydase	Mélange C lactoferrine
64	100	133	213

Ce tableau montre clairement l'effet de synergie des deux composés de la présente invention.

Tableau 2

Prise de poids (en g/jour)

Temps (sem.)	mélange de l'invention	mélange A (contrôle)	mélange B lactoperoxydase	mélange C lactoferrine
3	193	26	153	90
5	304	180	283	238

Ici l'effet de synergie est caractéristique, on remarque ainsi que l'on a un accroissement de 68% par rapport au contrôle, alors que le maximum obtenu avec les produits seuls est de 57% et 32% respectivement avec la lactoperoxydase et la lactoferrine.

Exemple 2

On a utilisé le mélange décrit à l'exemple 1 et on l'a administré pendant 10 semaines à des veaux, à raison de 8 l/jour à partir de la quatrième semaine, et en accroissant graduellement la concentration en matières solides de 13 à 25% entre la cinquième et la dixième semaine.

A titre de comparaison, on a donné un mélange qui ne contenait ni lactoferrine ni lactoperoxydase.

A la dixième semaine, on n'a plus constaté de diarrhées avec le mélange de l'invention, alors que ce n'était pas le cas avec le mélange de contrôle.

De plus, on a constaté une prise de poids de 865 g/jour avec le mélange de l'invention alors qu'on n'obtenait que 755 g/jour avec le mélange de contrôle.

Exemple 3

On a donné le mélange décrit à l'exemple 1 à des moutons à raison de 1,5 l/j.

On a observé des résultats similaires à ceux obtenus avec les veaux.

RE V E N D I C A T I O N S

- 1) Procédé de préparation de compositions alimentaires pour animaux et pour l'homme, comprenant un système antibactérien activé dans l'appareil gastro-intestinal au moyen d'un thiocyanate et d'un précurseur d' $H_2O_2$ , caractérisé en ce que l'on ajoute le système antibactérien à des compositions nutritives connues, ce système étant constitué par au moins de la lactoperoxydase et de la lactoferrine.
- 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on utilise un système antibactérien constitué de lactoperoxydase utilisée à une concentration de 2 à 20 mg/l de lactoreplaceur de préférence de 8 à 12 mg/l, et de lactoferrine utilisée à une concentration de 40 à 120 mg/l de lactoreplaceur et de préférence de 70 à 80 mg/l de lactoreplaceur.
- 3) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2 caractérisé en ce que le précurseur d' $H_2O_2$  du système antibactérien est choisi dans le groupe comprenant le système glucose-glucose oxydase, le système ascorbique-  $Cu^{++}$  les percarbonates alcalins, les peroxydes alcalino-terreux et les peroxydes de carbamide.
- 4) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'on ajoute le système activateur thiocyanate et précurseur d' $H_2O_2$  du système antibactérien, en une quantité telle qu'il y ait entre 10 et 100 ppm de  $OSCN^-$  produits sur une période de 30 minutes.
- 5) Composition alimentaire comprenant une composition nutritive connue en soi et un système antibactérien activé dans l'appareil gastro-intestinal au moyen d'un thiocyanate et d'un précurseur d' $H_2O_2$ , caractérisé en ce que le système antibactérien est constitué d'au moins de la lactoferrine et de la lactoperoxydase.

- 6) Composition alimentaire selon la revendication 5, caractérisée en ce que le système antibactérien est constitué de lactoperoxydase utilisée à une concentration de 2 à 20 mg/l de lactoreplaceur, de préférence de 8 à 12 mg/l de lactoreplaceur, et de lactoferrine utilisée à une concentration de 40 à 120 mg/l de lactoreplaceur de préférence de 70 à 80 mg/l de lactoreplaceur.
- 7) Composition alimentaire selon l'une quelconque des revendications 5 et 6 caractérisée en ce que le système antibactérien constitué par le mélange lactoferrine et lactoperoxydase est utilisé à une concentration d'au moins 45 mg/l de lactoreplaceur.
- 8) Composition alimentaire selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 caractérisée en ce que le précurseur d' $H_2O_2$  du système antibactérien est choisi dans le groupe comprenant le système glucose-glucose oxydase, le système acide ascorbique-  $Cu^{++}$  et les percarbonates alcalins, les peroxydes alcalino-terreux et les peroxydes de carbamide.
- 9) Composition alimentaire selon la revendication 8 caractérisé en ce que l'on introduit la glucose oxydase à une concentration de 1 à 10 mg/l de lactoreplaceur.
- 10) Système antibactérien, devant être administré par voie orale dans l'appareil intestinal, et activé par du thiocyanate et un précurseur d' $H_2O_2$ , caractérisé en ce qu'il consiste en lactoperoxydase et lactoferrine.
- 11) Procédé pour le traitement d'infections gastro-intestinales chez les mammifères souffrant d'infections gastro-intestinales provoquées par des bactéries, selon lequel on administre à une quantité thérapeutiquement efficace un système antibactérien activé par un thiocyanate et un précurseur d' $H_2O_2$ , caractérisé en ce que le système antibactérien est constitué par au moins de la lactoferrine et de la lactoperoxydase.