

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

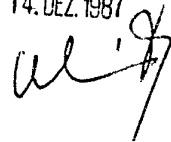
N.º 86 357

REQUERENTE: LABORATOIRE ROGER BELLON, francesa, com sede em
159 avenue A. Peretti, 92200 Neuilly-Sur-Seine
França.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA MISTURA DE
PÉPTIDOS RICA EM DI- E TRI-PÉPTIDOS, UTILIZAVEL
NOMEADAMENTE, NA NUTRIÇÃO ARTIFICIAL E EM DIE-
TÉTICA, E INSTALAÇÃO PARA A EXECUÇÃO DO REFERI-
DO PROCESSO".

INVENTORES:

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883. França em 15 de Dezembro de 1986, sob
o nº 86 17515.



Patente Nº-86357

- R E S U M O -

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA MISTURA DE PÉPTIDOS RICA EM DI- E TRI-PÉPTIDOS, UTILIZÁVEL, NOMEADAMENTE, NA NUTRIÇÃO ARTIFICIAL E EM DIETÉTICA, E INSTALAÇÃO PARA A EXECUÇÃO DO REFERIDO PROCESSO"

Descreve-se um processo para a preparação de uma mistura de péptidos rica em di- e tri-péptidos, a partir de um hidrosilato enzimático de proteínas, sendo o referido processo caracterizado por compreender:

- a cromatografia deste hidrolisato numa coluna de uma resina permutadora de catiões sob forma ácida,
- a lavagem da coluna de resina permutadora por meio de água,
- a eluição da referida coluna de resina permutadora por meio de uma solução aquosa alcalina, e
- a recuperação da fracção do eluato enriquecido em di- e tri-péptidos, particularmente daquela que sai da coluna de resina permutadora, a partir do momento em que o índice de refração desse eluato tenha atingido o valor 5 e até ao momento em que o pH desse eluato tenha atingido o valor 8.

A mistura de péptidos rica em di- e tri-péptidos de acordo com o presente invento é utilizável, com vantagem, na nutrição artificial e em dietética.

Descreve-se ainda uma instalação para a execução do referido processo que é caracterizada por compreender uma coluna (1) de resina permutadora de catiões sob forma ácida, estando a referida coluna equipada:

- por um lado, na sua parte superior:
 - com uma entrada (4) de hidrolisato de proteínas ultrafiltrado, com uma entrada (7) de água destilada apirogênica, estéril de enxaguamento, de eluição ou de regeneração,
 - com uma entrada (9) de solução aquosa alcalina de eluição ou de regeneração, com uma entrada (11) de solução aquosa ácida de regeneração,
- por outro lado, na sua parte inferior:
 - com uma saída (12) para escoar o efluente da coluna estando esta saída eventualmente ligada a um aparelho de ultrafiltração (18) e depois a um filtro esterilizado (22) e seguidamente a um posto de condicionamento e de secagem (23), e

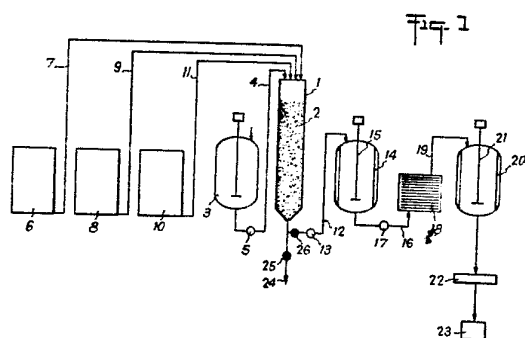
Handwritten signature/initials

1 finalmente meios para o controlo do índice de refração e do pH do efluente da coluna.

Figuras 1 e 2.

5

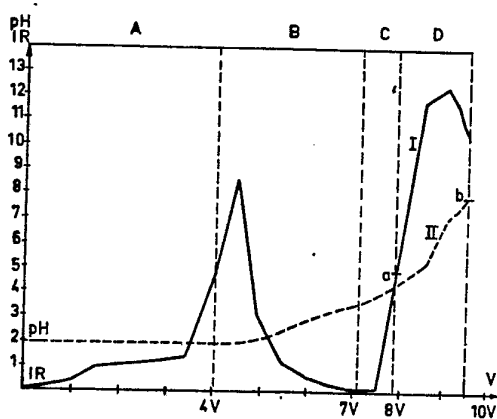
10



15

Fig. 2

20



25

30

35

14. DEZ. 1987
al'g

10

15

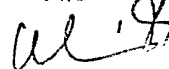
20

25

30

35

14. DEZ. 1987



1 Uma nutrição completa necessita da administração de azoto sob a forma de prótidos (proteínas, péptidos, aminoácidos) em mistura com lípidos, hidratos de carbono, elementos minerais e vitaminas.

5 Numa alimentação normal a maior parte do azoto consumido é ingerida sob a forma de proteínas e digerida pelos enzimas do tracto digestivo.

10 No entanto, num grande número de situações citadas em que a nutrição artificial é utilizada, a digestão efectiva das proteínas não é possível devido a deficiências enzimáticas devidas a doenças ou à porção limitada do intestino que continua funcional após a doença ou a intervenção cirúrgica. Esse problema tem sido resolvido de forma clássica pelo emprego de soluções de aminoácidos puros.

Em nutrição artificial, essas misturas de aminoácidos apresentam, no entanto, numerosos inconvenientes teóricos e práticos:

- 15 - os aminoácidos são transportados desde o intestino por meio de processos de transporte activo. Diferentes aminoácidos entram em competição para o transporte e a absorção intestinal pode ser limitada por essa competição;
- 20 - certos estados patológicos podem perturbar o transporte de certos aminoácidos, provocando uma redução da capacidade de absorção;
- certos aminoácidos, nomeadamente a tirosina e a cistina, são pouco solúveis na água e essa falta de solubilidade limita a disponibilidade dessas matérias nutritivas importantes;
- 25 - certos aminoácidos existem sob a forma de amidos nas proteínas (asparagina e glutamina). Esses aminoácidos amidados são instáveis em solução e desaminam-se em ácido aspártico e em ácido glutâmico, respectivamente; em particular, a glutamina, se bem que importante na nutrição artificial é assim deficiente nas misturas clássicas de aminoácidos;
- 30 - para utilização intravenosa, uma solução de aminoácidos suficientemente concentrada para transportar a quantidade de azoto necessária, tem uma capacidade de osmose que é demasiado elevada para injeção através das veias superficiais usuais, dado que provoca danos nos tecidos (as flebites são o mais corrente exemplo disso).

35 Este problema pode ser evitado por meio da implantação de

14. DEZ. 1987

al

1 catêteres nas veias profundas.

No entanto, esse processo cirúrgico é complicado e apresenta um risco séptico importante. Estes problemas podem limitar seriamente a utilização intravenosa das soluções nutritivas à base de aminoácidos.

5 Foi demonstrado recentemente (Silk D.B.A. Peptide absorption in man-Gut 15 194 (1974); Matthews D.M. Intestinal absorption of peptides - Phys. Rev. 55 537 (1975); Adibi S.A. e Y.S. Kim Peptides absorption and Hydrolysis in Physiology of the gastrointestinal tract. Ed. L.R. Johnson, Raven Press New York 1073) que a molécula de péptido que compreende de 2
10 a 3 aminoácidos ligados por ligações péticas (di- ou tri-péptidos respectivamente) é absorvida em estado intacto a partir do intestino, por um mecanismo distinto do que é posto em funcionamento no transporte dos aminoácidos.

Aparentemente, as células de superfície do intestino absorvem
15 os di- e tri-péptidos, hidrolisam-nos in situ em aminoácidos e libertam os aminoácidos assim obtidos no sangue. Existe, ao nível renal, um processo semelhante (reabsorção com hidrólise dos di- e tri-péptidos e passagem dos aminoácidos para a circulação sanguínea).

Tendo em mente o precedente, uma mistura nutritiva que contém
20 di- e tri-péptidos como fontes de azoto, apresenta diversas vantagens ligadas a:

- à estabilidade dos aminoácidos aminados,
- ao forte teor de azoto devido à boa solubilidade dos di- e tri-péptidos,
- 25 - à capacidade de osmose reduzida.

A digestão enzimática das proteínas tem sido largamente usada como meio de produção de misturas de péptidos inferiores ou "pequenos péptidos".

Assim, todas as preparações descritas contêm um grande espectro de comprimentos de cadeia péptida (de 2 a mais de 20 aminoácidos) mas
30 o teor em di- e tri-péptidos especialmente requerido é muito fraco (da ordem dos 5 a 20%).

Péptidos superiores aos di- e tri-péptidos não mostram as vantagens de absorção cinética anteriormente descrita e assim essas misturas de péptidos mal definidos não produzem uma absorção de azoto ópti-
35

al. 9.

1 ma nas utilizações clínicas.

Para a utilização intravenosa, as misturas que contêm quantidades apreciáveis de peptídeos superiores não são satisfatórias por duas razões suplementares:

- 5 - em primeiro lugar, os peptídeos superiores com 3 aminoácidos são excretados na urina, sem reabsorção subsequente. A utilização de azoto é assim muito ineficaz, com perdas que podem atingir os 60%.
- em segundo lugar, os peptídeos superiores comportam o risco de apresentarem pontos antigénicos intactos com a possibilidade de provocarem a
- 10 produção de anti-corpos ou mesmo uma reacção anafilática.

Assim, os hidrolisatos enzimáticos de proteínas não são convenientes para a produção de misturas que apenas contenham di- e tri-peptídeos.

- Pode-se igualmente preparar os di- e tri-peptídeos por síntese química e a experiência demonstrou que essas misturas de di-peptídeos
- 15 podem ser utilizadas duma maneira eficaz na nutrição artificial (FURST P. Peptides in parenteral nutrition - Clinical Nutrition 4 (Suppl.1985) p 105; KRZYSIK B.A. e ADIBI S.A. Comparision of metabolism of glycine injected intravenously in free and dipeptide forms; STEINHARDT H.J.PALEOS
- 20 G.A., BRANDL M., FEKL W.L., ADIBI S.A. - Efficacy of synthetic dipeptide mixture as the source of amino acids for total parenteral nutrition in a subhuman primate).

No entanto, esta abordagem apresenta igualmente inconvenientes:

- 25 - em primeiro lugar, a totalidade dos di-peptídeos possíveis (em número de 400) não pode ser sintetizada razoavelmente; a experimentação baseava-se, portanto, num número limitado de di-peptídeos que continham a glicina (quer dizer, a glicina - X, em que X é um outro aminoácido).

Esta abordagem limita os di-peptídeos disponíveis e pode arrasar um desequilíbrio devido ao excesso de glicina.

30

- em segundo lugar, uma outra limitação da abordagem por meio de síntese química, é o custo de produção dos di-peptídeos que é muito elevado para uma utilização em nutrição.

O presente invento permite obviar os inconvenientes dos processos clássicos acima expostos e refere-se a um processo para a produ-

35

1 ção de misturas de péptidos que cont m, principalmente, di- e tri-p pti-
dos a partir de um hidrolisato enzimático de proteínas, por meio da ex-
tracção cromatográfica dos di- e tri-péptidos, sob forma não pitog nica
concentrada, podendo ser convenientes para utilização clínica em nutrição
5 artificial e com um teor em elementos minerais compatível com a adminis-
tra  o por via intravenosa. As misturas de péptidos assim obtidos podem
também ser utilizadas na alimentação oral e entérica.

Conforme mencionado anteriormente, na alimentação oral ou en-
t rica os di e tri-péptidos oferecem diversas vantagens relativamente aos
10 elementos nutritivos vulgares (também denominados poliméricos) e às die-
tas elementares (que cont m pr tidos sob forma de aminoácidos).

A primeira vantagem é de ordem cinética; ao nível intestinal,
a contribuição azotada é mais rápida quando os pr tidos se encontram sob
a forma de di- e tri-péptidos do que no caso deles se encontrarem sob
15 formas elementares ou oligoméricas (produtos da digestão gástrica e pan-
cre tica).

Uma segunda vantagem tem que ver com a não competição ao n -
vel da absorção, que existe entre os di- e tri-péptidos, por um lado, e
os aminoácidos por outro.

20 Uma terceira vantagem tem que ver com a muito boa solubilida-
de dos pequenos péptidos (elevado teor de tirosina; possibilidade de te-
rem solutos a mais de 25g de azoto por litro).

Uma quarta vantagem está ligada à fraca proporção capacidade
de osmose/azoto (duas a três vezes melhor do que a dos solutos de amino -
25 cidos).

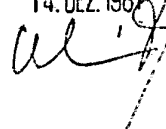
Pode-se portanto conceber que em determinadas condições pato-
lógicas, em que os sistemas de transporte dos aminoácidos estejam pertur-
bados, a absorção dos di- e tri-péptidos possa não ser modificada.

O interesse dos di- e tri-péptidos na alimentação parent ri-
ca reside em três pontos:

30 1 .- Um soluto de di- e tri-péptidos em quantidade de azoto igual   de
um soluto de aminoácidos, apresenta uma capacidade de osmose duas
a três vezes mais fraca.

Isto é particularmente importante porque permite uma contribuição
35 azotada suficiente para as necessidades nutritivas dos doentes por

14. DEZ. 1987



1 vias periféricas, o que é impossível com os solutos de aminoácidos. Além disso, a fraca capacidade de osmose dos solutos de di- e tri-péptidos diminui nitidamente os riscos de complicação do tipo flebite e outras patologias do sistema circulatório.

5 Finalmente e sobretudo, a utilização dos vasos periféricos em lugar dos vasos profundos é mais fácil e muito menos perigosa no que se refere ao perigo séptico.

29.- Os solutos de aminoácidos não contêm glutamina dado que este aminoácido, primordial em matéria de anabolismo, é instável na água. Em contrapartida, os péptidos que contêm a glutamina são muito mais estáveis em solução aquosa. O que se diz para a glutamina é igualmente válido para a asparagina.

39.- Certos aminoácidos estão em quantidades limitadas nos solutos de aminoácidos, por razões de solubilidade; o caso mais característico é o da tirosina.

15 Os di- e tri-péptidos que contêm a tirosina têm uma solubilidade que permite fazer face às necessidades de tirosina dos doentes dependentes de uma alimentação parentérica.

O que se diz para a tirosina é válido para outros aminoácidos cuja solubilidade é igualmente fraca.

20 O presente invento tem por objecto um processo para a preparação de uma mistura de péptidos rica de di- e tri-péptidos, a partir de um hidrolisato enzimático de proteínas que contêm di- e tri-péptidos e oligopéptidos superiores aos tri-péptidos, compreendendo o referido processo:

- 25 - a cromatografia desse hidrolisato numa coluna de uma resina permutadora de catiões sob forma ácida,
- a lavagem da coluna de resina por meio de água, de preferência estéril, apirogênica,
- a eluição da referida coluna de resina permutadora por meio de uma solução aquosa de um agente alcalino,
30 - e a recuperação da fracção do eluato enriquecida em di- e tri-péptidos.

Mais particularmente, a fracção do eluato enriquecida em di- e tri-péptidos, é a que sai da coluna de resina permutadora após o momento em que o índice de refração desse eluato atingiu o valor 5 e até ao momento em que o pH do mesmo eluato tenha atingido o valor 8, momento em

35

1 que a recuperação da referida fracção está terminada.

O hidrolisato enzimático de proteínas que constitui a matéria de partida utilizada no processo de acordo com o presente invento, é um produto da digestão enzimática das proteínas que foi ultra-filtrado e que
5 contém simultaneamente os péptidos e os aminoácidos, incluindo os referi-
dos péptidos os di-péptidos, os tri-péptidos e os oligopéptidos superiores aos tri-péptidos.

De um ponto de vista industrial, as proteínas utilizáveis para a fabricação desse hidrolisato compreendem, a título de exemplo, as seguintes:
10

- clara de ovo (ovalbumina
- proteínas do leite; lacto-albuminas e caseínas
- proteínas de matadouro : albumina do soro, hemoglobina descolorida
- produtos da indústria das pescas e da conserva de peixe
- 15 - produtos de origem vegetal : proteínas de soja e de luzerna

Do ponto de vista industrial, as enzimas utilizáveis para esta fabricação podem ser, por exemplo, os seguintes:

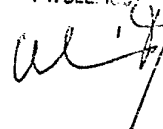
- enzimas de origem micro-orgânica que se costumam subdividir em três categorias:
20 - as utilizáveis em meio ácido (pH 1,5-4);
- as utilizáveis a um pH vizinho da neutralidade (pH 5,0 - 8,0);
- as utilizáveis em meio alcalino (pH 7 - 11).

A Molsin^R Fujisawa C.K.K. e a Sanprose^R Hankyu Kyoei Bussan K.K. pertencem à primeira categoria; a Neutrase^R Novo, a Protease B500^R
25 Rapidase Gist Brocades e a H.T. Proteolítica^R Miles, pertencem à segunda categoria; a Alcalase^R Novo, a Protease A2^R Rapidase Gist Brocades e a Optimase^R Miles, pertencem à terceira categoria.

- enzimas de origem animal: essencialmente a pepsina, a cromotripsina, a tripsina
- 30 - enzimas de origem vegetal: as mais utilizadas são a papaína, a ficina, a bromelina.

A acção de uma ou de várias dessas enzimas sobre uma ou várias dessas proteínas, leva a hidrolisatos que podem conter de 10 a 50% de di- e tri-péptidos.

35 As resinas permutadoras de catiões sob a forma ácida utili-



1 záveis de acordo com o presente invento devem responder aos critérios seguintes:

- corresponderem às necessidades de descationização (dessalgamento) e de separação peptídica.
- 5 - apresentarem uma excelente resistência física e química.
- apresentarem uma grande estabilidade e uma longa duração de utilização.
- ter uma capacidade de permuta elevada
- ter condições de utilização de pH e de temperaturas bastante amplas.
- ter uma capacidade mínima de dilatação.
- 10 - ser de fácil regeneração.
- ser de um preço de fabrico aceitável.
- ser de fácil fornecimento.
- ser de qualidade reproduzível.

Podem utilizar-se as resinas permutadoras de catiões sob a forma de ácidos, de tipo clássico, utilizadas na desmineralização clássica ou na separação de ácidos aminados; particularmente, podem utilizar-se as resinas permutadoras de catiões fortemente ácidas, com esqueleto polistirênico, portador de agrupamentos ácidos sulfônicos, apresentados sob a forma de sólidos microporosos e nomeadamente as comercializadas sob as marcas seguintes:

"Duolite" da Duolite International

"Amberlite" da Rohm & Haas,

"Dowex" da Dow Chemical,

"Lowatit" da Bayer.

25 As resinas catiónicas fortemente ácidas, com estrutura macroporosa, seguintes, são as preferidas:

- Duolite^R tipo XE 521-251 (copolímero estireno-divinilbenzeno com agrupamentos de ácidos sulfônicos; densidade aparente 0,85 g/cm³; granulometria compreendida entre 0,2 e 0,7 mm).
- 30 - Amberlite^R tipo 200C (copolímero estireno-divinilbenzeno com agrupamentos de ácidos sulfônicos; densidade aparente 0,80 g/cm³; granulometria 0,45-0,60 mm).

A solução aquosa de agente alcalino utilizada para a eluição da coluna de resina permutadora pode ser uma solução de soda ou de potassa com uma concentração igual ou inferior a 2N.



1 A quantidade de hidrolisato a carregar na coluna de resina
permutadora é igual ou inferior à necessária para saturar completamente
a referida resina permutadora; a saturação dessa resina permutadora é ob
tida com 400 g, aproximadamente, de prótidos por litro de resina permuta
5 dora.

A título de exemplo, as condições óptimas a observar são as
seguintes:

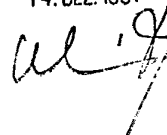
- volume da resina permutadora: V
- temperatura : entre 4 e 80°C e de preferência entre 60 e 80°C
- 10 - débito : de 1,5 a 3 V/h
- carga do hidrolisato : 2 a 5 V (conforme a concentração em prótidos
do hidrolisato, correspondente a 400 g de prótidos por litro de resina
permutadora)
- lavagem H₂O : 2 a 3 V
- 15 - eluição :
- concentração da solução de agente alcalino:
KOH : 0,5 a 2 N e de preferência N
ou NaOH : de 0,5 a 2 N e de preferência N
- recuperação da fracção do eluato rica em di- e tri-péptidos :
20 início : IR = 5
fim : pH - 8

A fracção do eluato enriquecida em di- e tri-péptidos pode
eventualmente ser purificada por ultra-filtração, concentrada ou diluída
se necessário, depois por filtração esterilizadora e condicionada sob a
25 forma de um líquido ou pode ser seca em forma de pó.

Esta fracção do eluato enriquecida em di- e tri-péptidos, sob
forma purificada, líquida ou em pó, constitui a mistura de péptidos ri
ca em di- e tri-péptidos de acordo com o presente invento. Esta mistura
é utilizável em nutrição artificial e em dietética e, mais particularmen
30 te, em nutrição parentérica.

As principais características deste produto são:

- líquido estéril e apirogénico
- teor de azoto de até 25 gramas/litro
- capacidade de osmose inferior a 400 miliosmois por litro a 12 g/l de
35 azoto.



- 1 - teor em sódio, potássio e cálcio praticamente nulo
- teor em cloretos inferior a 15 meq/l
- teor em amoníaco inferior a 5 meq/l

para um produto não passado pelo auto-clave (filtração esterilizadora) e
5 da ordem de 10 meq/litro para um produto passado pelo auto-clave
- teor em di-, tri, tetrapéptidos da ordem de 90% em peso por peso
- teor de di-, tri-péptidos superior a 70% em peso por peso
- teor em aminoácidos livres igual ou inferior a 5%

10 A originalidade do invento situa-se no facto de que um só tra
tamento do hidrolisato enzimático o desionisa e fracciona de forma que se
obtem uma fracção muito enriquecida em di- e tri-péptidos.

O presente invento refere-se igualmente às misturas de pépti
dos ricos em di- e tri-péptidos obtidos directamente pelo processo de
acordo com o presente invento.

15 Descreve-se o invento com referência ao desenho anexo no qual

A figura 1 representa um esquema da instalação para a execução do
processo de acordo com o presente invento,

A figura 2 é um gráfico para se seguir a evolução do índice de
refracção IR e do pH do efluente da coluna de resina permutadora

20 De acordo com esse gráfico, a separação-purificação efectua-
-se em quatro passos. O passo A corresponde ao carregamento da coluna
com o hidrolisato de proteína ultra-filtrado; o passo B tem uma lavagem
com água com saída dos péptidos não retidos. Os passos C e D são os da
cromatografia propriamente dita (deslocamento por meio de uma solução
25 alcalina dos péptidos retidos). O efluente que sai dos passos A e B con-
tém, além dos aniões, os péptidos maiores do hidrolisato ultra-filtrado
(primeiro pico). O tamanho médio desses péptidos está compreendido entre
10 e 15 resíduos. O efluente que sai do passo C (início do segundo pico)
contém, sob forma diluída, péptidos intermediários (octa, hepta, hexa,
30 penta). Para além do passo D, saiem misturados com os pequenos péptidos
os catiões do hidrolisato (Na^+ , K^+ , NH_4^+).

A instalação para a execução do processo de acordo com o in-
vento comporta uma coluna vertical 1, cheia com uma carga 2 duma resina
permutadora de catiões sob forma ácida. Esta coluna é alimentada pela sua
35 parte superior e separadamente:

14. DEZ. 1987



- 1 - por um lado, com o hidrolisato de proteínas ultra-filtrado proveniente da cuva 3 via a conduta 4 e a bomba 5 ,
- por outro lado, com água destilada apirogênica estéril, de enxaguamento, de eluição ou de regeneração proveniente da cuva 6 via conduta 7,
5 - por outro lado ainda, com uma solução aquosa alcalina de eluição ou de regeneração, proveniente da cuva 8 via conduta 9,
- e finalmente, com uma solução aquosa de ácido clorídrico de regeneração proveniente da cuva 10 , via conduta 11.

10 O efluente da coluna 1 é enviado via conduta 12 e a bomba 13 na cuva tampão 14, munida de um agitador 15, a partir do qual é refluído via conduta 16 e a bomba 17 para um aparelho de ultra-filtração 18; o ultra-filtrado é evacuado pela conduta 19 para uma cuva tampão 20 munida de um agitador 21 e de lá é enviado para um posto de filtração esterilizadora 22 e depois para um posto de condicionamento ou de secagem 23.

15 A porção do efluente da coluna 1, que não é retida, é rejeitada através da conduta de evacuação 24.

A execução do processo de acordo com o invento na instalação descrita acima faz-se, de uma maneira geral, como segue:

20 O hidrolisato enzimático de proteínas ultra-filtrado, proveniente da cuva 3, é carregado na coluna de resina permutadora de catiões sob a forma H^+ ; medições de controlo do índice de refração e do pH são praticadas no efluente da coluna; este efluente é reenviado pela conduta 24.

25 Depois da carga do hidrolisato ultra-filtrado na coluna, lava-se a resina permutadora por meio de água destilada, apirogênica, estéril, proveniente da cuva 6; medidas do índice de refração e do pH são praticadas sobre o efluente da coluna; este efluente é igualmente reenviado pela conduta 24.

30 Procede-se então à eluição da coluna de resina por meio de uma solução aquosa de um agente alcalino (soda ou potassa) proveniente da cuva 8. Segue-se atentamente o índice de refração e o pH do efluente da coluna; rejeita-se esse efluente pela conduta 24 assim que o índice de refração do efluente fique inferior a 5; logo que o índice de refração do efluente tenha atingido o valor 5, fecha-se a comporta 25, montada na
35 conduta 24 e abre-se a comporta 26 para se enviar o efluente para a cuva

14. DEZ. 1987.



1 tampão 14 via conduta 12 e bomba 13; logo que o pH do efluente tenha atin-
gido o valor 8, fecha-se a comporta 26 e reabre-se a comporta 25 para re-
enviar o efluente pela conduta 24.

5 A fracção do efluente da coluna que sai desta entre um índice
de refracção 5 e um pH de 8, que é a fracção enriquecida de di- e tri-
-péptidos e que é recolhida na cuva 14, é submetida a uma ultra-filtração
num ultra-filtro 18, recolhida na cuva tampão 20, submetida a uma filtra-
ção esterilizadora no posto 22 e depois condicionada ou sêca no posto 23.

10 Eventualmente um passo de concentração ou de diluição pode
estar previsto antes ou depois da ultra-filtração feita em 18.

A resina cansada é regenerada:

- por meio de tratamento com a solução aquosa alcalina vinda da cuva 8,
 - lavagem por meio de água, de preferência estéril e apirogênica,
 - acidificação por meio da solução aquosa de ácido clorídrico proveniente
- 15 da cuva 10,
- enxaguamento por meio de água, de preferência estéril e apirogênica.

Descreve-se o invento com referência aos exemplos não limita-
tivos que se seguem, dados unicamente a título de ilustração.

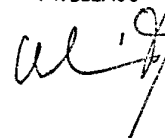
20 EXEMPLO I

Parte-se de um hidrolisato enzimático de caseína, obtido por
hidrolise da caseína láctica alimentar em meio alcalino pelas Neutrase^R,
Alcalase^R e Pem^R (estas três preparações enzimáticas, de que as duas
primeiras são proteases bacterianas e a terceira uma mistura de enzimas
pancreáticas, são comercializadas pela firma NOVO INDUSTRIE ENZYMES S.A.)
25 A hidrólise é seguida duma ultra-filtração. O hidrolisato assim obtido é
caracterizado por um grau de hidrólise (D H) superior a 33% e contém me-
nos de 8% de aminoácidos livres. O cálculo mostra que para um tal hidro-
lisato, o teor em di- e tri-péptidos está próximo de 50% em peso.

30 4 volumes (em relação ao volume da coluna 3) desse hidrolisa-
to, a 11 g/lítro de azoto, são vertidos sobre a resina permutadora de ca-
tiões sob forma H⁺, na ocorrência a resina Duolite^R tipo XE 521-251 (co-
mercializada pela firma DUOLITE INTERNATIONAL) contida na coluna 3.

35 O efluente da coluna é seguido em índice de refracção e em pH
Depois de carga de hidrolisato, a coluna é primeiramente lava

14. DEZ. 1987



1 da com 3 volumes de água destilada, apirogênica, estéril, depois eluida por uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 35 g/l.

Recupera-se a fracção do eluato enriquecida em di- e tri-péptidos que sai da coluna, logo que o índice de refração tenha atingido o
5 valor 5 e suspende-se a recuperação logo que o pH dessa fracção tenha atingido o valor 8.

Esta fracção é submetida a uma ultra-filtração e depois a uma filtração esterilizadora.

O rendimento em azoto está compreendido entre 40 e 60%, o rendimento de di- e tri-péptidos é de 75%.

As operações são conduzidas esterilmente na água apirogênica, a uma temperatura compreendida entre 60 e 80°C e a um débito de 2 volumes/hora (em m³/hora).

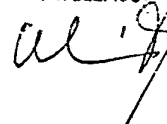
A composição e as características de fracção do eluato enriquecida em di- e tri-péptidos, que constitui o produto desejado de acordo com o invento, são mencionadas no quadro 1; as do hidrolisato enzimático ultra-filtrado de partida encontram-se aí igualmente mencionadas.

20

25

30

35



1

QUADRO 1

Composição e características do produto de acordo com o invento e do hidrolisato de partida.

5

(Hidrolisato de caseína)

		Hidrolisato ultra- -filtrado	Fracção do eluato enri- quecida em di- e tri- -péptidos
10	Azoto total	11 g/l	12,5 g/l
	Capacidade de osmose	490 mOs/Kg	250 mOs/Kg
	pH	7,6	7
	Sódio	80 meq/l	< 5 meq/l
	Potássio	35 meq/l	< 5 meq/l
15	Cálcio	10 meq/l	0
	Amoníaco	25 meq/l	<10 meq/l
	Cloro	25 meq/l	<10 meq/l
	Fósforo total	0,8 g/l	50 mg/l
	Esterilidade	não estéril	estéril
20	Pirogenia	pirogénico	apirogénico
	<u>Repartição dos péptidos</u>		
	Aminoácidos livres	7% em peso	3%
	Dipéptidos	25%	38%
	Tripéptidos	25%	38%
25	Tetrapéptidos	25%	19,5%
	Teor em di-,tri-pép- tidos	50%	76%
	Teor em di-,tri-pép- tidos, tetra-péptidos	75%	95,5%
30	Oligopéptidos (supe- riores aos tetrapép- tidos	18%	1,5%

35

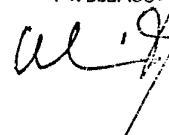


O teor em ácidos aminados, sob forma livre ou sob forma péptida, da fracção do eluato enriquecida em di- e tri-péptidos é fornecido no quadro II.

QUADRO II

Teor em ácidos aminados da fracção enriquecida em di- e tri-péptidos

Ácidos aminados	% em peso, sob forma péptica	% em peso, sob forma livre
Ácido Aspártico	96,8	3,2
+ Asparagina		
Treonina	96,1	3,9
Serina	96	4
Ácido Glutâmico		
+ Glutamina	97,7	2,3
Prolina	100	0
Glicina	90,4	9,6
Alanina	91,8	8,2
Valina	97,1	2,9
1/2 Cistina	100	0
Metionina	95,5	4,5
Isoleucina	100	0
Leucina	85,2	14,8
Tirosina	91,8	8,2
Fenilalanina	98,5	1,5
Lisina	94,6	5,4
Histidina	98,3	1,7
Triptofano	100	0
Arginina	80	20



O balanço de peptídeos global estabelecido em relação ao hidrolisato ultra-filtrado é fornecido no quadro III.

QUADRO III

Balanço total dos peptídeos relativamente ao hidrolisato ultra-filtrado.

	Recuperação	Eliminação
Aminoácidos livres	25%	75%
Dipeptídeos	74%	26%
Tripeptídeos	78%	22%
Tetrapeptídeos	44%	56%
Polipeptídeos (superiores aos pentapeptídeos)	5%	95%

A título de exemplo, o traçado da curva dos índices de refração IR (curva I) e o traçado da curva dos pH (curva II) das diversas fracções do efluente aquando das fases seguintes:

- carregamento do hidrolisato : fase A
- lavagem por meio de H₂O : fase B
- eluição com KOH, início da eluição : fase C
- eluição com KOH, recuperação da fracção enriquecida em di- e tri-peptídeos : fase D

(com início de recuperação, ponto a, IR = 5 da curva I e fim de recuperação, ponto b, pH = 8 da curva II), estão representados no gráfico da figura 2 fornecendo o índice de refração e o pH em ordenadas e o volume do efluente em V (volume da coluna de resina) em abcissas, para um volume de coluna de resina permutadora de catiões sob forma ácida de 200 cm³.

A fracção de efluente obtida aquando da fase A de carga do hidrolisato a um volume de 4 V; um índice de refração que aumenta de 0 a 5, um pH de 2; a obtida aquando da lavagem com água a um volume de 3V, um índice de refração crescente de 5 a 8,5, depois decrescente até zero, um pH crescente de 2 a 3,5; a obtida aquando da eluição com KOH, no iní-

14. DEZ. 1987



1 cio da eluição a um volume $\bar{e}$ de 0,75 V, um índice de refração crescente de 0 a 5, um pH crescente de 3,5 a 4,5; a fracção de eluato enriquecida em di- e tri-péptidos, recuperada entre IR = 5 (pH = 4,5) e pH = 8, a um volume de 1,75 V.

5 O quadro IV fornece a composição da caseína matéria prima em aminoácidos, do hidrolisato ultra-filtrado e do produto finalizado de acordo com o invento.

10

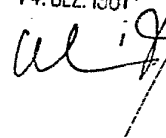
15

20

25

30

35



1

QUADRO IV

Composição de aminoácidos da matéria prima, do hidrolisato ultra-filtrado e do produto acabado de acordo com o invento.

5

(Resíduos em percentagem)

10

15

20

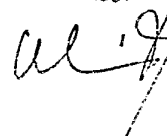
25

30

35

	Matéria prima	Hidrolisato ultra-fil- trado	Produto de acor- do com o invento
Ácido aspártico e asparagina	6,6	7,0	5,7
Treonina	5,6	5,7	4,4
Serina	7,2	6,8	4,4
Ácido glutâmico e glutamina	20,8	19,4	17,0
Prolina	12,3	12,0	13,0
Glicina	3,0	2,9	3,3
Alanina	4,0	4,2	5,0
Cisteína	0,5	2,9	4,0
Valina	6,9	6,6	6,5
Metionina	1,3	1,3	3,0
Isoleucina	2,7	3,0	4,3
Leucina	8,6	8,3	10,7
Tirosina	3,7	3,4	4,8
Fenilalanina	4,1	3,9	4,6
Lisina	7,4	7,3	7,8
Histidina	2,4	2,4	2,7
Triptofano	Não determinado	-	-
Arginina	2,9	2,9	2,4

14. DEZ 1987



EXEMPLO 2

Parte-se de um hidrolisato enzimático de albumina do ovo desnaturada obtida por hidrólise da clara do ovo pela Alcalase ^R, pela Neutrase ^R e pela Pem ^R. Estas três preparações enzimáticas são comercializadas pela firma NOVO INDUSTRIE ENZYMES S.A.. O hidrolisato assim obtido caracteriza-se por um grau de hidrólise (D H) superior a 30% e contém menos de 10% de aminoácidos livres. O cálculo mostra que para um tal hidrolisato, o teor em di- e tri-péptidos é próximo de 45% em peso.

A hidrólise é seguida duma ultrafiltração.

4 volumes (em relação ao volume da coluna) deste hidrolisato diluído em 9,5 g/litro de azoto, são vertidos sobre a resina permutadora de catiões sob forma H⁺, na ocorrência a resina Amberlite ^R tipo 200C (comercializada pela firma ROHM e HASS) contida na coluna 3.

O efluente desta coluna é seguido em índice de refração e em pH.

Após a carga da coluna com hidrolisato, a coluna é primeiramente lavada por 3 volumes de água, depois eluída por meio de uma solução aquosa normal de hidróxido de potássio.

Recolhe-se a fracção do eluato que sai da coluna logo que o índice de refração desse eluato tenha atingido o valor 5 e pára-se a recuperação logo que o pH dessa fracção atinge o valor 8.

Esta fracção recuperada é submetida a uma ultra-filtração e depois a uma filtração esterilizante.

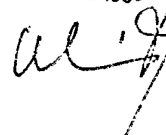
O rendimento em azoto é de 40% e o rendimento em di- e tri-péptidos é de cerca de 55%.

As operações são conduzidas esterilmente, de preferência em água apirogénica, a uma temperatura compreendida entre 60 e 80°C, a um débito de 1,5 a 2,5 volumes por hora.

A composição e as características da fracção do eluato enriquecida em di- e tri-péptidos que constitui o produto desejado de acordo com o invento, encontram-se mencionados no quadro V assim como as do hidrolisato ultra-filtrado de partida.

O quadro VI fornece, para cada ácido aminado, o teor sob forma péptica e sob forma livre.

14. DEZ. 1987



1 O quadro VII apresenta o balanço da separação-purificação
na coluna permutadora de catiões.

 O quadro VIII fornece a composição em aminoácidos da clara
do ovo matéria prima, do hidrolisato ultra-filtrado e do produto acabado
5 de acordo com o invento.

10

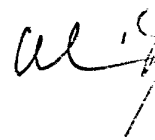
15

20

25

30

35



QUADRO V

Composição e características do produto de acordo com o invento e características do hidrolisato de partida.

(Hidrolisato de albumina do ovo)

	Hidrolisato ultra-filtrado sob forma concentrada	Fracção do eluato enriquecido em di- e tri-péptidos
Azoto total	15 g/l	13 g/l
Capacidade de osmose	900 mOs/Kg	315 mOs/Kg
pH	7,0	5,5
Sódio	150 meq/l	1,7 meq/l
Potássio	40 meq/l	0,6 meq/l
Cálcio	550 mg/l	32 mg/l
Cloro	20 meq/l	1,2 meq/l
Fósforo total	18 mg/l	3 mg/l
Esterilidade	não estéril	estéril
Pirogenia	pirogénico	apirogénico
<u>Repartição dos prôtidos</u>		
Aminoácidos livres	11%	9%
Dipéptidos	20,5%	30,0%
Tripéptidos	20,5%	30,0%
Tetrapéptidos	20,0%	13,0%
Teor em di- e tri-péptidos	41,0%	60,0%
Teor em di-, tri-, tetra-péptidos	61,0%	73,0%
Oligopéptidos (superiores aos tetra-péptidos)	28,0%	18,0%

59011
D3/PH/GPO/CCL
H5718 Cas 187

al. 7

QUADRO VI

Teor em ácidos aminados da fracção enriquecida em di- e tri-péptidos
(Hidrolisato da albumina do ovo)

Ácidos aminados	% em peso, sob forma péptica	% em peso sob forma livre
Ácido Aspártico	91,3%	8,7%
+ Asparagina		
Treonina	93,7%	6,3%
Serina	79,0%	21,0%
Ácido Glutâmico		
+ Glutamina	90,8%	9,2%
Prolina	100,0%	0%
Glicina	92,1%	7,9%
Alanina	90,0%	10,0%
Valina	97,1%	2,9%
1/2 Cistina	ND	ND
Metionina	91,6%	8,4%
Isoleucina	100,0%	0%
Leucina	87,0%	13,0%
Tirosina	89,0%	11,0%
Fenilalanina	87,0%	13,0%
Lisina	90,0%	10,0%
Histidina	96,0%	4,0%
Triptofano	ND	ND
Arginina	95,0%	5,0%

ND: Não determinado

al

QUADRO VII

Balanço p  ptico global relativamente
ao hidrolisato ultra-filtrado

(Albumina do ovo)

	Recuperação	Eliminação
Aminoácidos livres	23%	77%
Dipéptidos	42%	58%
Tripéptidos	42%	58%
Tetrapéptidos	19%	81%
Polip��ptidos (superiores aos pentap��ptidos)	18%	82%

al. 9

1

QUADRO VIII

5

Composição em aminoácidos da matéria prima, do hidrolisato ultra-filtrado e do produto final de acordo com o invento.

(Resíduos em percentagem)

10

15

20

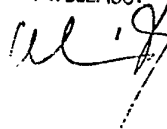
25

30

	Matéria prima	Hidrolisato ultra-filtrado	Produto de acordo com o invento
Ácido aspártico e asparagina	10,1	11,2	10,0
Treonina	5,4	5,6	4,9
Serina	7,6	8,7	8,0
Ácido glutâmico e glutamina	12,1	12,6	10,3
Prolina	3,7	3,4	3,5
Glicina	6,9	6,6	7,5
Alanina	9,1	9,7	10,7
Cisteína	1,9	2,0	ND
Valina	7,1	7,5	6,7
Metionina	4,0	3,3	3,8
Isoleucina	4,2	4,3	4,3
Leucina	8,1	7,7	8,0
Tirosina	2,8	2,1	2,6
Fenilalanina	4,2	3,5	4,0
Lisina	5,9	6,0	8,5
Histidina	1,8	1,8	2,6
Triptofano	0,9	0,7	ND
Arginina	4,2	4,0	4,6

ND = Não determinado

35



1

EXEMPLO 3

Este exemplo é relativo à apresentação farmacêutica de um ali-
mento dietético para alimentação entérica.

5

O hidrolisato em di- e tri-péptidos de acordo com o invento
é preparado conforme o exemplo 1 e 2, depois é diluído de modo a obter-se
30-60 g de prótidos/litro.

10

À solução péptica assim obtida são acrescentados os hidratos
de carbono sob a forma de maltodextrinas, lípidos sob a forma de óleos ve-
getais, vitaminas, sais minerais, oligo-elementos bem como diversos aditi-
vos tecnológicos necessários à manutenção em emulsão do produto acabado.
O alimento entérico assim constituído é esterilizado por meio da técnica
UHT, (UHT = Ultra Haute temperature - Temperatura ultra-elevada), depois
é repartido num volume compreendido entre 200 e 1000 ml, seja de caixas
15 metálicas, seja em embalagens em cartão Tetrabrik^R, seja ainda num outro
condicionamento.

A título de exemplo, uma fórmula tem 4180 kj/1 (ou seja
1000 kcal/1) com uma capacidade de osmose compreendida entre 300 e 450
mOs/Kg, apresenta a seguinte composição:

20

- hidrolisato purificado e enriquecido em pequenos péptidos

Volume correspondente à matéria seca: 21,0 g

- maltodextrinas 60,0 g

- amido 10,0 g

25

- mistura lípida
(óleo de soja, colza, onagro) 8,0 g

- triglicerinas de cadeias médias 8,7 g

- mistura vitamínica 0,1 g

- sulfato de magnésio 0,7 g

30

- cloreto de cálcio 0,2 g

- glicerofosfato de cálcio 0,8 g

- sulfato de ferro (ferroso) 0,01 g

- carbonato de manganês 0,003 g

- sulfato de zinco 0,008 g

35

- sulfato de cobre 0,002 g

- | | | | |
|---|---------------------------|-------|----|
| 1 | - iodeto de potássio | 0,05 | mg |
| | - emulsionante | 1,3 | g |
| | - anti-oxidante dos óleos | 0,003 | g |
| | - água destilada q.b.p. | 500 | ml |

5

EXEMPLO 4

Este exemplo é relativo à apresentação farmacêutica de um solu-
luto injectável de contributo azotado utilizável em alimentação parentéri-
ca.

O hidrolisato enriquecido em di- e tri-péptidos de acordo com
o invento é preparado conforme o exemplo 1 e 2 e conforme indicado na fi-
gura 2.

Antes da repartição dos locais estéreis e de acordo com as
boas práticas de fabrico da indústria farmacêutica, juntam-se 0,5-1,5 g
por litro de hidrosulfito de sódio como agente anti-oxigenante.

O produto é finalmente esterilizado no autoclave (120°C, 20
min.) em frascos de vidro de 125, 250, 500 ou ainda 1000 ml.

20

EXEMPLO 5

Este exemplo é relativo à apresentação farmacêutica de um con-
centrado de péptidos utilizável para as perfusões em veia profunda e em
mistura extemporânea com lípidos injectáveis e glucose injectável (alimen-
tação parentérica total). O fabrico é semelhante ao do exemplo 4, mas com
25 porta além disso uma operação de concentração para aumentar o teor em azo-
to protídico do produto para um valor compreendido entre 15 e 30 g de azo-
to/litro.

O produto assim obtido é seguidamente condicionado e apresen-
tado como o produto descrito no exemplo 4.

O depósito do primeiro pedido para o invento acima descrito,
foi efectuado em França, em 15 de Dezembro de 1986, sob o nº.86 17515.

35

al. g.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

12. Processo para a preparação de uma mistura de péptidos rica em di- e tri-péptidos, utilizável, nomeadamente, na nutrição artificial e em dietética, a partir de um hidrolisato enzimático de proteínas, que contém di- e tri-péptidos e polipéptidos superiores aos tri-péptidos, sendo o referido processo caracterizado por compreender:

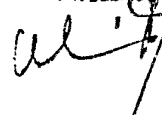
- a cromatografia deste hidrolisato numa coluna de uma resina permutadora de catiões sob forma ácida,
- a lavagem da coluna de resina permutadora por meio de água, de preferência estéril, apirrogénica,
- a eluição da referida coluna de resina permutadora por meio de uma solução aquosa de um agente alcalino, e
- a recuperação da fracção do eluato enriquecida em di- e tri-péptidos.

22.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a fracção do eluato enriquecida em di- e tri-péptidos a recuperar, ser a que sai da coluna de resina permutadora entre o momento em que o índice de refração desse eluato atingiu o valor 5 e o momento em que o pH desse eluato atingiu o valor 8, momento em que a recuperação da referida fracção terminou.

32.- Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado por:

- se cromatografar, na coluna de resina permutadora de catiões sob forma H^+ , 2 a 5 volumes de hidrolisato enzimático de proteínas (em relação ao volume da coluna), de acordo com a concentração de prótidos do hidrolisato, sendo a quantidade de hidrolisato carregada na coluna, no seu total, igual ou inferior à quantidade de saturação da resina permutadora, que corresponde a cerca de 400 g, de prótidos por litro de resina permutadora,

- se lavar a coluna de resina permutadora com 2 a 3 volumes de água,
- se eluir a coluna de resina permutadora por meio de uma solução aquosa de soda ou de potassa com uma concentração igual ou inferior a 2 N,
- se seguir o índice de refração e o pH do eluato e se recuperar a fracção do eluato que sai da coluna de resina permutadora desde o momento em que o índice de refração desse eluato tenha atingido o valor 5, até ao momento em que o pH desse eluato tenha atingido o valor 8, constitu-



- 1 indo essa fracção do eluato a mistura de péptidos rica em di- e tri-
-péptidos.
- 4a.- Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, carac-
terizado por a fracção de eluato enriquecida em di- e tri-péptidos
5 ser purificada por meio de ultrafiltração.
- 5a.- Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por estar
previsto um passo de concentração ou de diluição, antes ou depois da
ultrafiltração.
- 6a.- Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por a frac-
10 ção do eluato enriquecido em di- e tri-péptidos purificada por ultra
filtração ser submetida a uma filtração esterilizante, e em seguida con-
dicionada sob a forma de um líquido ou sêca sob a forma de um pó.
- 7a.- Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, carac-
terizado por a temperatura ser mantida a 4-80°C de preferência a
15 60-80°C.
- 8a.- Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, carac-
terizado por a solução aquosa de agente alcalino ser uma solução
aquosa de soda ou uma solução aquosa de potassa de concentração inferior
ou igual à normalidade.
- 20 9a.- Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, carac-
terizado por o hidrolisato enzimático de proteínas ser um produto de
digestão enzimática da clara do ovo ou da caseína.
- 10a.- Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, ca-
racterizado por a resina permutadora de catiões em forma ácida, ser
25 uma resina catiónica fortemente ácida, com estrutura polistirênica, que é
portadora de agrupamentos ácidos sulfônicos e apresentado sob a forma de
sólidos macroporosos.
- 11a.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se uti-
lizar a mistura de péptidos rica em di- e tri-péptidos na confecção
30 de composições para nutrição artificial oral, entérica.
- 12a.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se uti-
lizar a mistura de péptidos rica em di- e tri-péptidos na confecção
de composições para nutrição artificial parentérica.
- 13a.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se uti-
35 lizar a mistura de péptidos rica em di- e tri-péptidos na confecção

1 de composições dietéticas.

14a.- Instalação para a execução do processo para a preparação de uma mis
tura de péptidos rica em di- e tri-péptidos a partir de um hidrolí-
sato enzimático de proteínas de acordo com qualquer uma das reivindica-
5 ções 1 a 10, caracterizada por compreender uma coluna (1) de resina per-
mutadora de catiões sob forma ácida, estando a referida coluna equipada:

- por um lado, na sua parte superior:

com uma entrada (4) de hidrolisato de proteínas ultrafiltrado.

10 com uma entrada (7) de água destilada apirogénica, estéril de enxagua-
mento, de eluição ou de regeneração,

com uma entrada (9) de solução aquosa alcalina de eluição ou de rege-
neração,

com uma entrada (11) de solução aquosa ácida de regeneração,

- por outro lado, na sua parte inferior:

15 com uma saída (12) para escoar o efluente da coluna, estando esta
saída eventualmente ligada a um aparelho de ultrafiltração (18), e
depois a um filtro esterilizador (22) e seguidamente a um posto de
condicionamento e de secagem (23), e finalmente meios para o contro
lo do índice de refração e do pH do efluente da coluna.

20 Lisboa, 14. DEZ. 1987

Por LABORATOIRE ROGER BELLON, Sociedade Anónima

O AGENTE OFICIAL



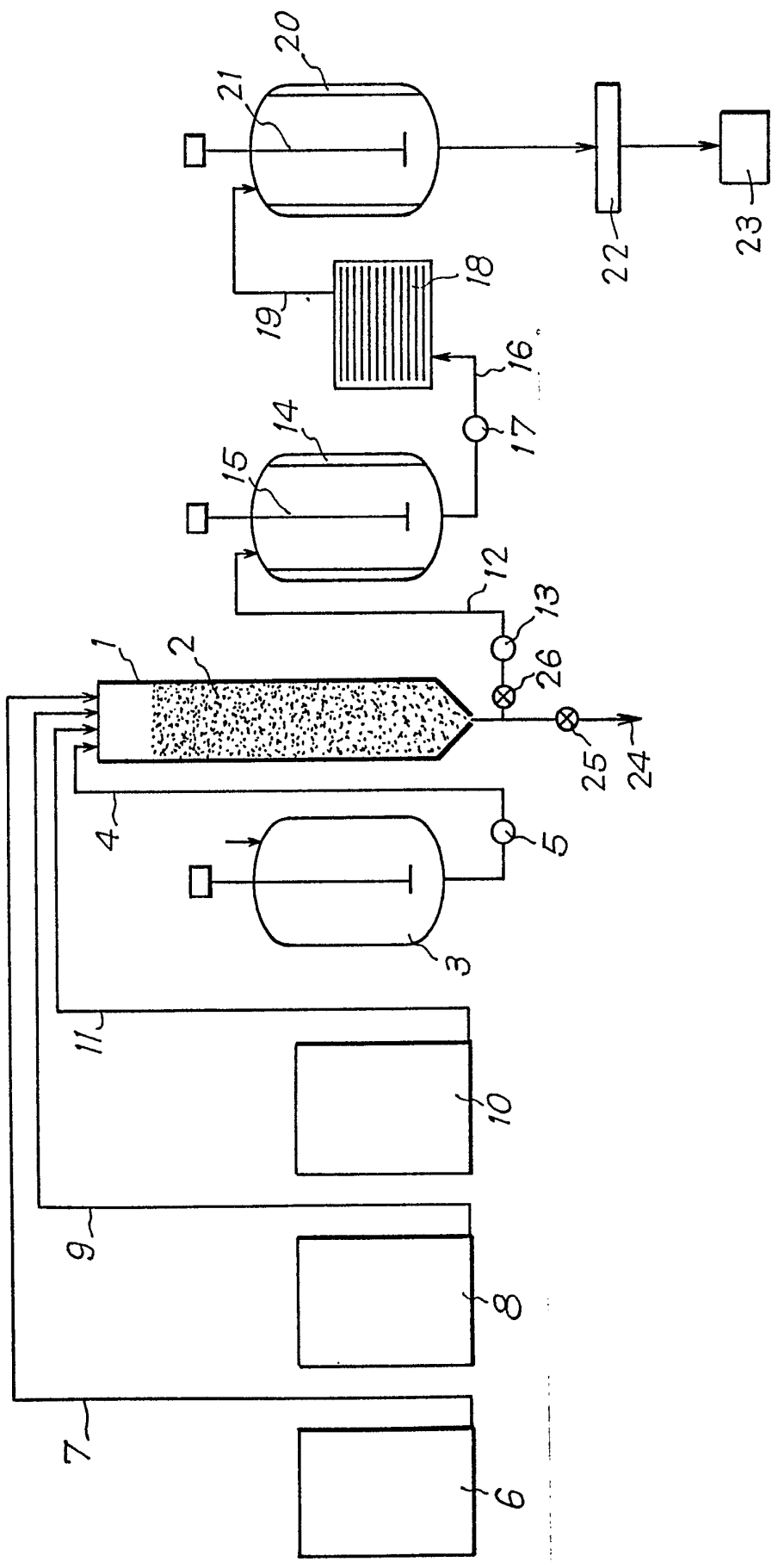
25

30

35

al'g

Fig. 1



al. 9

Fig. 2

