

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

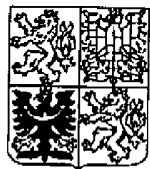
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1590-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14. 11. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **20.11.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/9604251**

(33) Země priority: **SE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13. 10. 99**
(Věstník č. 10/99)

(86) PCT číslo: **PCT/SE97/01918**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/21978**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 23 K	1/16
A 23 K	1/165
A 23 L	1/10
A 23 L	1/185
A 23 L	1/30

(71) Přihlášovatel:

**RURAL PATENT SVENSKA AB, Stockholm,
SE;**

(72) Původce:

**Lange Stefan, Göteborg, SE;
Göransson Leif, Kageröd, SE;
Lönnroth Ivar, Mölndal, SE;**

(74) Zástupce:

**PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1,
Praha 4, 14000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Antisekretivní proteiny indukované
potravou**

(57) Anotace:

Použití výrobků s enzymatickou aktivitou pro přípravu potravy, včetně krmení, která po konzumaci indukuje antisekreční proteiny. Výrobky s enzymatickou aktivitou jsou např. sladované obiloviny.

CZ 1590-99 A3



Antisekreční proteiny indukované potravou

Oblast techniky

Vynález se týká použití výrobků s enzymatickou aktivitou pro přípravu potravy vyvolávající tvorbu antisekrečních proteinů (ASP) a takto připravené potravy.

Dosavadní stav techniky

K intenzivní sekreci tělesných tekutin dochází v řadě různých situací. Značný příjem potravy před fyzickou námahou vede ihned k sekreci tělesné tekutiny do střeva. Fyzická námaha jako taková vede k výtoku tekutiny do svalů a kloubů. Tento jev způsobuje ztuhlost a sníženou výkonnost. Podráždění střevní stěny různými činitly dodává ihned stolici nepříjemně měkkou konzistenci.

Ve Švédsku je více než 10 000 osob, které se podrobily ostomii, a každý rok přibývá dalších 1000 případů. Přitom je nezanedbatelné části těchto osob provedena ileostomie. V případech, kdy sekrece překračuje jeden litr denně, vznikají často problémy z důvodu nadměrného výtoku tekutiny do sáčku, který je umělým vývodem pro odchod stolice, což vyžaduje pravidelné výměny a vyprazdňování sáčku. Pro každého jednotlivce to s sebou přináší značné nepříjemnosti vzhledem k omezení společenských činností, snížení pracovní výkonnosti, nedostatku tekutin, kalorií a minerálů. Osoby s těmito problémy měly zatím problémy s nalezením účinné pomoci.

V posledních letech byla učiněna významná zjištění ohledně schopnosti těla regulovat výsledný výtok tekutiny a elektrolytů do střeva. Byly nalezeny různé peptidy se schopností zvyšovat resorpci tekutin a elektrolytů skrz střevní stěnu. Nejvýznamnější z těchto peptidů podobných hormonům jsou somatostatin a neuropeptid γ (D. T. Krieger a J. B. Martin: N. Engl. J. Med. 304: 376-885, 1981; J. Miller: Regulatory peptides 4 (dodatek): 203-208, 1985) a dále antisekreční proteiny (S. Lange a I. Lönnroth: FEMS Microbiol. Letters 24: 165-168, 1984; S. Lange a I. Lönnroth: Biochim. Biophys. Acta 883, 138-144, 1986). ASP mění sekreci a zvyšuje resorpci tekutiny a elektrolytů ve střevě.

Z SE 9000028-2 (publikace č. 466331) je známo, že tvorbu antisekrečního faktoru (ASF) nebo antisekrečního proteinu lze u zvířat stimulovat krměním potravou obohacenou určitým množstvím aminokyselin a/nebo cukrů a/nebo amidů. Díky tvorbě tohoto

antisekrečního faktoru lze u zvířat snížit výskyt průjmů vzniklých z různých příčin. Stanovením obsahu ASP způsobem popsáním v tomto patentu lze upravit množství aminokyselin a cukrů tak, že se účinné množství ASP dá produkovat za komerčně zajímavou cenu.

Je též známo, že pokrmů z rýže a pšenice i vývary z nich lze použít pro rehydrataci průjmů (např. Khin-Maung-U a William Greenough III: J. Pediatrics 118, 72-85 (1991)). Pro kompenzaci ztráty těchto látek se často podávají soli. Účel těchto přípravků je pouze kompenzace ztráty tekutiny, ke které již došlo.

Podstata vynálezu

Vynález se týká potravy zmírňující nebo odstraňující potíže a jevy spojené s výše popsanou nežádoucí sekrecí tělesných tekutin. Předmětu vynálezu je dosaženo použitím výrobků s enzymatickou aktivitou. Potrava připravená s těmito výrobky vyvolává po požití tvorbu antisekrečních proteinů.

Během studia tvorby ASP bylo překvapivě zjištěno, že tvorba ASP je stimulována nejen přidáním aminokyselin a cukrů, ale též potravinami, do nichž byly přidány enzymy se schopností hydrolyzovat obsažené sacharidy a proteiny takovou rychlostí, že se ve střevním kanálu objeví množství cukrů a aminokyselin známých per se. Bylo překvapivě zjištěno, že tvorbu ASP lze kontrolovat nebo ovládat změnami množství a poměrů výrobků s enzymatickou aktivitou. Díky tomu lze připravit potraviny a takovým obsahem prostředku, že obsah ASP daný opakovanou konzumací bude moci být předpověděn se značným stupněm jistoty. Tato skutečnost je zvláště významná, neboť reakce na danou dávku se liší mezi různými skupinami jedinců.

Zvláště překvapivé je zjištění, že sladované obilniny mají schopnost dodat účinná množství cukrů a aminokyselin. To skýtá možnost připravovat potraviny, které jsou výživné, chutné a dokáží stimulovat tvorbu ASP.

Výraz „potrava“, ve smyslu používaném v tomto textu zahrnuje potravu určenou pro konzumaci lidmi i krmivo pro konzumaci zvířaty. Touto potravou jsou s výhodou výrobky v podobě chleba, sušenek, těstovin, zrní a vloček, kaše a ovesné kaše, ale např. i výrobky zahrnující maso a masné výrobky, tuk a výrobky obsahující tuk nebo mléko a mléčné výrobky.



Podle výhodného provedení vynálezu jsou při přípravě potravy indukující ASP použity sladované obilniny.

Výraz „obilniny,, ve smyslu používaném v tomto textu zahrnuje obvyklé druhy obilnin jako pšenice, ječmen, žito, oves, rýže, kukuřice, proso, durha a čirok.

„Sladované obilniny,, je zdravé a čerstvé zrní, které bylo sladováno. Sladování znamená, že zrno je máčeno a pak ponecháno klíčit ve vodě přísně kontrolovaného složení za přísně kontrolované teploty, dokud se nevytvoří zárodky výhonků. Doba klíčení je přizpůsobena danému množství a rozmanitosti. Vyklíčené zrno je sušeno a výhonky jsou odstraněny. Sušení lze provádět s následkem větší či menší změny enzymové aktivity. Získaným výrobkem je slad. Výživné látky v zrní byly v omezené míře hydrolyzovány a byly aktivovány enzymy výhonků. Tato částečná hydrolyza usnadňuje též rozklad výživných látek endogenními enzymy trávicího systému. Je zřejmé, že stupeň hydrolyzy je zvýšen i jistým předvařením nebo tepelným zpracováním.

Při přípravě potravinových výrobků lze sladované obilniny přidat ve směsi s nesladovanými obilninami v takovém poměru, aby byly po konzumaci připraveného pokrmu indukovány ASP.

Testy ukázaly, že i výrobky z obilnin, které běžně tvoří značnou část denního příjmu potravy, mohou být obohaceny enzymy nebo s výhodou sladovými výrobky, a tak po konzumaci způsobit žádoucí indukci ASP.

Množství a poměr sladovaných a nesladovaných (pokud jsou vůbec přidány) obilnin požadované pro zamýšlený účinek lze snadno odborně stanovit v rutinních testech, při nichž je měřena reakce na indukci dané potraviny způsobem uvedeným v SE 9000028-2. Stručně řečeno, způsob zahrnuje měření standardizované sekreční reakce v tenkém střevě krysy.

Bylo zjištěno, že hladina ASP nutná pro dosažení žádaného účinku je alespoň 0,5 jednotek/ml krve (1 jednotka = množství ASP vedoucí k 50% inhibici reakce na toxin cholery, jak je popsáno v Příkladu 1).

Je zřejmé, že potraviny připravené způsobem podle vynálezu se liší v mnoha ohledech a lze je realizovat v mnoha různých provedeních. Díky tomu se lze vyvarovat monotónnosti diety. Potřebu stimulace různých jednotlivců pro dosažení účinné koncentrace ASP lze stanovit měřením reakce na příjem dané potraviny, jak bylo uvedeno. Způsobem

podle vynálezu lze též kompenzovat různou aktivitu enzymových přípravků i rozdíly v enzymatické aktivitě u různých sladovaných obilnin.

Dále je zřejmé, že potravu lze připravit mnoha různými způsoby i vzhledem k požadavkům chutnosti a rozmanitosti. Potraviny na bázi sladovaných obilnin lze připravit v podobě obilných vloček, chleba, rohlíků a těstovinových výrobků za použití známé techniky. Při přípravě výrobků, kde je třeba zvlhčení vodou, např. při přípravě chleba, byly předpisy pozměněny na základě známých pekařských zkušeností. Je též zřejmé, že výrobky mohou být připraveny jako prášek pro zamíchání do vody, limonády nebo jiné tekutiny a konzumovány jako nápoj.

Mezi masnými výrobky obsahujícími sladované obilniny lze zmínit masové směsi s obsahem zrna nebo uzeniny s přídavkem sladovaného zrna. Při přípravě potraviny je samozřejmě rozhodující, zda je dosaženo požadované stimulace tvorby ASP.

Schopnost připravit potraviny indukující ASP v předem stanoveném rozsahu je cenná především z toho důvodu, že existuje mnoho situací, kde je žádoucí snížená sekrece tělesných tekutin, např. při tělesné námaze. Je dobře známo, že atleti trpí měkkou stolicí, když se snaží o extrémní výkony a zároveň přijímají velké objemy jídla a tekutin pro přísun energeticky bohatých sacharidů. Požárníci a vojáci mají podobné problémy jako reakci na stresové situace, kterým jsou vystaveni. Zvláštní problém vzniká při řízení rychlých letadel, kde vzniká přetížení několik g. Piloti musí nosit zvláštní hygienické ubrousky, čemuž by se bylo možno vyhnout, pokud by jejich stolice byla upravena novou dietou. Potraviny připravené podle vynálezu mají v těchto situacích eventuálně značnou hodnotu.

Vynález je dále ilustrován následujícími příklady, které však nijak neomezují jeho rozsah.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 : Pokusy se sladovanými obilninami na skupině osob vybraných pro experimentální účely

Skupině lidí vybraných pro experimentální účely byly k snídani podávány pokrmy tvořené různými obilnými výrobky. Vzorky krve byly odebrány před a po zkušební periodě. Z těchto vzorků byly izolovány antisekreční proteiny (ASP) afinitní chromatografií způsobem

popsaným v SE 9000028-2. Obsah ASP ve vzorcích byl měřen biochemickým stanovením v krysách, a to způsobem, jenž byl popsán již dříve (S. Lange: FEMS Microbiol. Letters 15: 239-242, 1982). Stručně řečeno, tento způsob zahrnuje voperování podvázané smyčky doprostřed tenkého střeva krysy, intravenózní injekci vzorku ASP a krátce nato injekci toxinu cholery (3 μ g) do střevní smyčky. Po 5 hodinách je zvíře usmrceno a je zjištěna jeho hmotnost a délka oddělené střevní smyčky. Reakce zvířat (mg tekutiny na 1 cm střeva), kterým byl injikován vzorek, je porovnávána s kontrolními zvířaty, kterým byl injikován pouze pufr.

Podávaná dieta:

1. chléb pečený z bílé mouky s 30% obsahem krmiva „Frisk-plus,, (L. Göransson a kol.: J. Vet. Med., B, 40, 478-484, 1993)
2. chléb pečený z bílé mouky s 30% obsahem běžné ječné mouky
3. chléb pečený z bílé mouky s 30% obsahem sladované ječné mouky
4. vločky s obsahem sladovaného ovsa

Výsledky pokusu jsou uvedeny v následující tabulce, kde jsou udány iniciály osob, které se podrobily pokusu a aktivita v jednotkách ASP na 1 ml (1 jednotka = množství ASP vedoucí k 50% inhibici reakce na toxin cholery). Čisté množství přidávaných obilnin (tj. bez započtení pšeničné mouky nebo jiných obilnin, které zkoumané osoby požíly po jídle obsahujícím testované obilniny) je uvedeno v závorkách.

Den	Dieta, dny	Aktivita APS v krvi, jednotky ASP/ml	
		EE	SL
-135	-	0,0	0,0
-150	chléb „Frisk+,,, 8 dní	1,4 (15 g)	0,9 (26 g)
-52	-	0,0	0,0
-31	ječný chléb , 10 dní	0,0 (29 g)	0,0 (50 g)
0	-	0,0	0,1
8	sladovaný ječný chléb, 7 dní	1,0 (25 g)	0,5 (50 g)
21	-	0,0	0,4
28	sladované ovesné vločky, 13 dní	1,3 (25 + 25 g)	0,6 (60 g)
37	-	0,6	1,1

		EJ	IJ	IL
0	-	0,0	0,0	0,1
12	sladované ovesné vločky, 10 dní	1,0 (25 + 25 g)	0,7 (25 + 25 g)	1,0 (25 + 25 g)
19	-	0,5	-	0,8

ASP se zřejmě v lidské krvi za normálních podmínek nevyskytuje. Po požití chleba „Frisk+„ byly v krvi EE a SL indukovány ASP. Tyto dvě osoby požily pak postupně chléb s obsahem běžné ječné mouky a chléb s obsahem sladované ječné mouky. Chléb z běžné ječné mouky neindukoval ASP. Chléb ze sladované ječné mouky indukoval ASP. Dvanáct dní potom, co osoby EE a SL přestaly konzumovat tento chléb, klesla hodnota ASP na 0,0 jednotek (1 jednotka = množství ASP vedoucí k 50% inhibici reakce na toxin cholery) u EE a 0,4 jednotek (1 jednotka = množství ASP vedoucí k 50% inhibici reakce na toxin cholery) u SL. Tytéž osoby konzumovaly sladované ovesné vločky v kyselém mléce. I v tomto případě byly indukovány ASP. Podobně jako v předchozím případě dosáhla hladina ASP u EE vysoké hodnoty během zkušebního období a pak rychle poklesla, zatímco u SL dosáhla nejvyšší hodnoty za týden po zkušebním období. Pokus se sladovanými ovesnými vločkami byl opakován s dalšími třemi osobami. Všechny tři osoby měly vysokou hladinu ASP v krvi během zkušebního období a k jistému poklesu došlo také týden po ukončení konzumace testovaných vloček.

Příklad 2

Pokusy s krmením pro prasata s přídavkem enzymů

Pokusy na právě odstavených prasatech byly prováděny podobným způsobem, jako bylo popsáno Göranssonem a kol. (1993). Prasatům bylo podáváno běžné krmivo bez přídavku antibiotik, velmi podobné krmivu „Lantmännens Växfor“, a totéž krmivo natrávené přidanými enzymy (směs α - a β -amylas), a to v množství 2x5 litrů, poprvé v době 3 dny před dnem odstavení prasat. Vzorky krve byly odebrány v den odstavení (den 0) a 6 dní po odstavení (den 6). Výsledky ukazují, že v krvi kontrolované skupiny nebyla nalezena detekovatelná množství ASP, zatímco testovaná skupina měla v krvi hodnoty 0,9 jednotek/ml



(1 jednotka = množství ASP vedoucí k 50% inhibici reakce na toxin cholery, jak je popsáno v Příkladu 1) již v den 0 a tato hodnota vzrostla na 1,5 jednotek/ml ($n = 10$ na skupinu).

Příklad 3

Během pokusů se ukázalo, že krysy mají podobné reakce na antisekrečně indukující činidla jako lidé. Pro odborníka je tedy jednodušší provést kontrolované pokusy na krysách než na lidech. Způsob měření indukce antisekrečního účinku na krysách je popsán v SE 9000028-2.

V běžném laboratorním testu byla část krmiva pro krysy nahrazena testovaným materiálem. Krysy byly před experimentem krmeny 7 dní kontrolní a testovanou potravou. Osmého dne bylo vyvoláno zduření (sekrece ven) ve střevě injekcí 3,5 mikrogramů toxinu cholery. Byla zjištěna hmotnost zduřelého střeva a porovnána s hmotností střeva zvířat kontrolní skupiny. Tento poměr byl měřítkem stupně antisekrečního účinku nebo inhibice sekrece.

Během experimentu byly zjištěny následující hodnoty hmotnosti střeva a rozsahu inhibice:

Dieta	Počet zvířat	Hmotnost střeva	Stupeň inhibice
		mg/cm	%
Kontrolní krmivo	3	453 ± 3	-
80 % kontrolního krmiva a 20 % ovesných vloček upravených v páře	3	443 ± 16	2 (není signif.)
80 % kontrolního krmiva a 20 % sladované pšenice	3	82 ± 5	82 (signif.)

Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že nejvýznamnější inhibice sekrece nebo jinak řečeno významného stupně antisekrečního účinku bylo dosaženo ve skupině krys, které byly krmeny 20 % potravou ve formě sladované pšenice.

Průmyslová využitelnost

Vynález se týká prostředků s enzymatickou aktivitou, jejichž konzumací je indukována tvorba antisekrečních proteinů (ASP), které snižují sekreci tělesných tekutin do střeva vyvolanou např. fyzickou námahou, stresem atd. Lze tak připravit výživné, chutné a rozmanité potraviny, které mají schopnost zmírňovat nebo odstraňovat problémy s touto nežádoucí sekrecí.



PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití výrobků s enzymatickou aktivitou pro přípravu potravin indukujících po konzumaci antisekreční proteiny (ASP), které regulují výtok tekutiny a elektrolytů do střeva, a to v takovém množství, že 1 ml krve obsahuje alespoň 0,5 jednotky ASP (1 jednotka = množství ASP vedoucí k 50% inhibici reakce na toxin cholery).
2. Použití podle nároku 2, vyznačující se tím, že výrobky s enzymatickou aktivitou jsou sladované obilniny.
3. Použití podle nároku 2, vyznačující se tím, že sladované obilniny jsou ječmen, pšenice, žito nebo oves.
4. Použití podle nároku 2, vyznačující se tím, že sladované obilniny jsou rýže, kukuřice nebo čirok.
5. Použití podle kteréhokoliv z nároků 2 až 4, vyznačující se tím, že sladované obilniny jsou ve směsi s nesladovanými obilninami.
6. Použití podle nároku 1, vyznačující se tím, že připravené potraviny jsou vločky vhodné k snídani, chléb, rohlíky nebo těstovinové výrobky.
7. Potraviny připravené podle některého z nároků 1 až 6, vyznačující se tím, že mají schopnost indukovat po konzumaci antisekreční proteiny (ASP), které regulují výtok tekutiny a elektrolytů do střeva, a to v takovém množství, že 1 ml krve obsahuje alespoň 0,5 jednotky ASP (1 jednotka = množství ASP vedoucí k 50% inhibici reakce na toxin cholery).
8. Potraviny podle nároku 7, vyznačující se tím, že jsou v podobě vloček vhodných k snídani, chleba, rohlíků nebo těstovinových výrobků.
9. Potraviny podle nároku 7, vyznačující se tím, že jsou v podobě prášku pro zamíchání do tekutiny za vzniku nápoje.