



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 018**

51 Int. Cl.:
A61K 9/127 (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98958288 .7**
96 Fecha de presentación : **01.12.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **1035836**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.09.2000**

54 Título: **Composición que contiene una enzima y un agente que estabiliza dicha enzima, y procedimiento para mejorar la estabilidad de una enzima y evitar su degradación o para proteger y/o inmovilizar una enzima.**

30 Prioridad: **01.12.1997 FR 97 15073**
27.03.1998 FR 98 03807

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.10.2009

73 Titular/es: **CAPSULIS**
Parc d'Activités de Canteranne
avenue de Canteranne
33600 Pessac, FR

72 Inventor/es: **Degert, Corinne;**
Laversanne, René;
Roux, Didier y
Ugazio, Stéphane

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 327 018 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición que contiene una enzima y un agente que estabiliza dicha enzima, y procedimiento para mejorar la estabilidad de una enzima y evitar su degradación o para proteger y/o inmovilizar una enzima.

La presente invención se refiere a una composición que contiene una enzima y un agente destinado a evitar la degradación de dicha enzima.

La invención se refiere asimismo a un procedimiento para mejorar la estabilidad de una enzima y evitar su degradación así como a un procedimiento para proteger y/o inmovilizar una enzima.

Ya sea en cosmética, en farmacia, en detergencia o también en agroalimentación, la funcionalidad de un producto se debe generalmente a la presencia de una molécula denominada materia activa o agente activo. A título de ejemplo, se pueden citar las vitaminas, usadas en agroalimentación y en farmacia, las enzimas usadas en detergencia, los organofosforados usados como insecticidas, o también los aromas y perfumes usados en la higiene, la agroalimentación o la cosmética.

Una de las características esenciales de un producto industrial o farmacéutico, además de su actividad y de su eficacia, es su estabilidad, de manera que se obtiene un producto que tiene una duración de vida suficiente. Desafortunadamente, numerosas materias activas son unas moléculas particularmente frágiles, cuya degradación bajo el efecto de las condiciones del entorno es demasiado rápida para obtener la duración de vida deseada del producto que lo contiene. Es el caso de ciertas vitaminas tales como las vitaminas C, A o E, de muchas enzimas como por ejemplo las proteasas, y más generalmente de muchas proteínas y moléculas biológicas, o también en el campo de los insecticidas, del malatión y de los piretrinoides y, de manera más general, de las moléculas reductoras u oxidantes.

Se han elaborado numerosas estrategias para evitar la degradación de estas moléculas activas frágiles. Estas estrategias dependen de la naturaleza de la reacción que provoca la degradación. Las reacciones incriminadas más frecuentemente son o bien la hidrólisis, o bien la oxidorreducción. Otras reacciones más específicas también tienen lugar, tal como la autoproteolisis en el caso de las proteasas.

En el caso en el que el agua es una causa directa o indirecta de la degradación, una simple solución consiste en evitar el contacto de la molécula activa con un medio acuoso. Es el caso, por ejemplo, de insecticidas disueltos en un disolvente orgánico, y utilizados como aerosol. Desafortunadamente, esta posibilidad no existe todavía, tal como por ejemplo para la cosmética o la agroalimentación, que, por razones evidentes, no pueden usar los disolventes orgánicos. Además, la tendencia actual, por razones ecológicas y de salud pública, es la supresión del uso de disolventes orgánicos en todas las ramas de la industria.

Cuando el agua es sólo una causa indirecta, por ejemplo, por efecto de oxidación por el oxígeno disuelto, se puede trabajar con un agua desgasificada. De manera más general, se puede trabajar en atmósfera inerte, al mismo tiempo para la fabricación y la conservación del producto final. Esta solución se usa frecuentemente en agroalimentación, en la que los productos líquidos enriquecidos con vitaminas están acondicionados o bien al vacío, o bien bajo atmósfera inerte. Desafortunadamente, este método permite limitar la degradación sólo hasta la apertura del contenedor. Por lo tanto, no es aplicable en el caso de productos que necesitan una larga duración de vida después de la apertura.

Las enzimas son unas proteínas que catalizan de manera muy específica unas reacciones químicas. Se usan mucho industrialmente, por ejemplo, en los detergentes para ropa para degradar las proteínas (proteasas), los lípidos (lipasas) o los residuos amiláceos (amilasas), facilitando así la limpieza. Estas proteínas son en general inestables en disolución, y se usan por lo tanto sobre todo en los detergentes para ropa en polvo. Su uso en detergente líquido (para la ropa o la vajilla) es muy limitado debido a su inestabilidad a largo plazo.

Asimismo, una tendencia actual es el uso de enzimas en cosmética, por ejemplo unas proteasas para ayudar a la desescamación de la piel, y por lo tanto a su renovación. En este caso también la inestabilidad de las enzimas impide su uso simple.

La inmovilización de enzimas es un tema muy desarrollado, por lo menos en la investigación, siendo las aplicaciones industriales no muy numerosas todavía. Los trabajos sobre la encapsulación de enzimas forman parte del campo de la bioencapsulación que comprende asimismo la encapsulación de organismos "vivos" (levaduras, bacterias, etc.). En general, se recurre a unos polímeros que forman una matriz que inmoviliza la enzima.

En estos trabajos, se trata generalmente de inmovilizar la enzima (o la levadura) para tenerla en forma fácilmente manipulable, como por ejemplo unas microperlas que se pueden extraer del medio de reacción, después de usar, mediante simple filtración o tamizado según su tamaño. Por consiguiente, la forma encapsulada de la enzima debe conservar su actividad. El material de encapsulación debe ser suficientemente poroso para dejar difundir el sustrato y los productos de reacción. Una revisión de estos desarrollos se puede encontrar en "Bioencapsulation in biotechnology, Biomat, Art. Cells & Immob. Biotech., 21, 291-298 (1993)".

Las principales reacciones que conducen a la pérdida de actividad de una enzima son la degradación química, la pérdida de configuración espacial o la agregación de varias enzimas. Los métodos usados típicamente para evitar o limitar los excesos de estas degradaciones son la modificación química de la molécula y la inmovilización.

5 La protección de enzimas frente a su desnaturalización mediante encapsulación es menos corriente. En efecto, dejando que las matrices polímeras usadas en la inmovilización difundan los sustratos, éstas son demasiado porosas para proteger realmente la enzima. Las principales reacciones de degradación son las que alcanzan las proteínas. Se trata en particular de hidrólisis específicas de las uniones entre aminoácidos y de reacciones que conducen a una
10 desnaturalización mediante el cambio de conformación que no implica ninguna unión covalente, pero que provoca una pérdida de actividad de la enzima, mediante la modificación de la accesibilidad del sitio catalizador por ejemplo. Así, en el artículo "Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres, J. Microencapsulation, 14, 51-61 (1997)", se muestra que es necesario reticular previamente la enzima mediante un glutaraldehído para asegurar su protección, lo que induce una pérdida de 50% de su actividad.

15 En el caso de las enzimas, por ejemplo en los detergentes líquidos o en las cremas cosméticas, no es posible usar un disolvente no acuoso, al mismo tiempo por razones de seguridad y de coste. La introducción de enzimas en este tipo de producto se enfrenta por lo tanto a unas dificultades reales. Una solución, a veces adoptada en cosmética, consiste en usar un envase sofisticado, constituido por dos depósitos independientes, conteniendo uno la molécula activa y conteniendo el otro el resto de la preparación. La mezcla se efectúa extemporáneamente en el momento del uso del
20 producto, gracias a un sistema de doble bomba dosificadora en el frasco. Esta solución es bastante costosa, y poco cómoda de usar. Esta solución se ha realizado asimismo en el caso de la cosmética para proponer unos productos de belleza que contienen vitaminas.

Otro método consiste también en separar el agente activo de su medio, pero de manera microscópica, microencapsulándolo en unas microesferas de polímero, o revistiéndolo, por ejemplo, mediante una técnica de revestimiento en lecho fluidizado, en una matriz polímera. Esta técnica puede resultar interesante, en particular para unos productos destinados a ser incorporados en unas formas secas. Adolece del inconveniente de necesitar la ruptura de la cáscara o del revestimiento polímero para liberar el agente activo. Por lo tanto, está poco adaptada para unos productos cosméticos en los que la liberación del agente activo debe realizarse espontáneamente en el momento de la aplicación del
30 producto, o para unos productos alimenticios, que deben liberar su agente activo en la boca.

Cuando la inestabilidad de la materia activa es moderada, el uso de moléculas protectoras puede resultar interesante. Es el caso de los agentes antioxidantes usados ampliamente en las cremas cosméticas y en los productos alimenticios. Generalmente, son simplemente añadidos a la preparación, pero debido a la dilución, es necesario añadir una cantidad más importante de lo necesario para obtener un efecto. Por otro lado, como muchos aditivos, su uso
35 tiende a estar cada vez más reglamentado, y las dosis permitidas disminuyen.

Es conocido encapsular unos principios activos en unas vesículas a base de tensoactivos.

40 Estas vesículas presentan generalmente una o varias bicapas. Se hablará de vesículas unilamelares cuando están constituidas por un núcleo acuoso rodeado de una bicapa de tensoactivos y de vesículas paucilamelares o multilamelares cuando presentan varias bicapas. Entre las vesículas multilamelares, se distinguen las que se designarán a continuación como "vesículas multilamelares o MLV de tipo clásico", y unas vesículas de estructura muy particular que se designarán a continuación como "vesículas multilamelares de estructura en cebolla". Estos dos tipos de
45 vesículas multilamelares se distinguen por tres diferencias fundamentales:

1º. Su procedimiento de obtención

El procedimiento de obtención de las MLV clásicas usa generalmente una mezcla preliminar en medio disolvente
50 orgánico de los lípidos y otros componentes que constituyen la envoltura de dichas MLV, y después la evaporación del disolvente para obtener una película seca. Las vesículas se obtienen a continuación mediante la rehidratación de esta película de lípidos mediante una disolución acuosa que contiene el agente activo a encapsular.

Las vesículas multilamelares de estructura en cebolla se obtienen, a su vez, mediante el cizallado de una fase
55 lamelar cristal-líquido que comprende el agente activo a encapsular.

2º. Su estructura

Debido su modo de preparación, las MLV clásicas son unos agregados de hojas multilamelares de tipo lipídico
60 reunidas en una membrana lipídica aproximadamente esférica. Esta estructura aparece muy claramente en la fotografía proporcionada en la patente US nº 4.975.282.

Los liposomas se obtienen más frecuentemente a partir de las MLV clásicas descritas anteriormente, después de la aplicación de un cizallado muy fuerte (mediante ultrasonidos o prensa de French), que los transforman en vesículas
65 unilamelares o paucilamelares caracterizadas por la presencia de un núcleo acuoso.

Las vesículas multilamelares de estructura en cebolla se presentan, a su vez, en forma de un apilamiento regular de bicapas concéntricas que parte del núcleo mismo de las vesículas hasta su periferia.

3°. *Su naturaleza termodinámica*

En el interior de las vesículas multilamelares clásicas, el número de hojas multilamelares, su número de capas, el número de repliegues y su disposición son unas características que dependen del modo de preparación y en particular de fenómenos cinéticos que intervienen durante la rehidratación de la película lipídica. La estructura interna de las vesículas no es uniforme en el seno de una vesícula (zonas de poca curvatura, zonas de gran curvatura, zonas multilamelares, zonas continuas). Por lo tanto, dicha estructura no está en equilibrio termodinámico. Además, cada vesícula tiene una constitución diferente, y por lo tanto no existe ninguna uniformidad de estructura en toda la muestra.

Se han descrito, en particular en la solicitud WO 96/31 194 unos liposomas de tipo clásico paucilamelar constituidos por algunas capas que rodean un núcleo acuoso, en los que se encuentran asociados una molécula y su estabilizante.

Unas composiciones en las que un agente activo se encuentra encapsulado en unas vesículas multilamelares de estructura de cebolla, constituidas, desde su centro hasta su periferia, por una sucesión de capas lamelares separadas por un medio líquido se encuentran ya descritas en diferentes patentes referenciadas a continuación. Estas vesículas se pueden obtener mediante un procedimiento que comprende la preparación de una fase lamelar cristal-líquido y su transformación mediante la aplicación de un cizallado. Dicho procedimiento se describe en particular en la patente WO 93/19735 procedente de la patente francesa FR 2 689 418 o WO 95/18601 incluidos en la presente memoria a título de referencia.

Según la patente francesa FR 2 689 418, esta transformación se puede realizar durante una etapa de cizallado homogéneo de la pasta cristal-líquido, lo que conduce a unas vesículas también denominadas micro-cápsulas de tamaño controlado. Sin embargo, actuando sobre la formulación de la fase lamelar cristal-líquido, en particular sobre la naturaleza de los tensoactivos que entran en su composición, la transformación de esta fase cristal-líquido en vesículas se puede obtener mediante simple sollicitación mecánica, en particular durante la mezcla de los constituyentes.

El solicitante ha descrito diferentes aplicaciones de este tipo de vesículas. Se citará, en particular, la solicitud internacional WO 95/19707 que describe unas composiciones olorosas en las que un producto oloroso se encuentra incorporado en el seno de dichas vesículas multilamelares, siendo el efecto de dicha encapsulación aumentar la remanencia del olor, debido a la ralentización de la evaporación. Se citará asimismo la solicitud francesa FR 2 735 658 que describe unas composiciones de uso alimentario en las que un producto o un aditivo de uso alimentario se encuentra incluido en el seno de dichas vesículas multilamelares, teniendo como efecto esencial obtener una liberación controlada particularmente ventajosa del producto encapsulado, permitiendo la presencia de la vesícula multilamelar además proteger, antes de su introducción en las composiciones, las moléculas frecuentemente frágiles que se encuentran incorporadas en ellas.

Sin embargo, dicha composición, incluso si aporta en ciertos casos un efecto ya sustancial sobre la estabilización de las moléculas frágiles, puede resultar insuficiente para unas moléculas particularmente sensibles o de las cuales se busca obtener una estabilización particularmente aumentada frente a un entorno *a priori* desfavorable,

Así, los inventores de la presente invención han descubierto ahora que la acción de protección de moléculas frágiles ya observada en el caso particular de ciertos productos del campo alimentario, podía aumentar considerablemente mediante la incorporación en el seno de las vesículas multilamelares de estructura en cebolla de un agente destinado a estabilizar estas moléculas frágiles. Dicha presentación del par producto activo/agente estabilizante permite obtener una estabilización aumentada, y por lo tanto una duración de vida de los productos que incorporan el agente activo aumentada con unas concentraciones claramente más bajas en agente estabilizante, lo cual constituye una ventaja considerable de la presente invención.

La presente invención resulta interesante en todos los campos en los que se busca proteger un agente activo frente a una acción de degradación. Se aplica en este caso a las enzimas.

La invención proporciona un medio particularmente eficaz que permite asegurar al mismo tiempo la función de inmovilización de una enzima y su protección frente al medio exterior con vistas a mejorar su estabilidad.

Así, la presente invención ofrece una solución particularmente económica y eficaz a los problemas relacionados con la estabilización de las enzimas con, además, todas las ventajas relacionadas con la técnica de encapsulación usada:

- gran flexibilidad de formulación,
- gran variedad de tensoactivos que se pueden utilizar;
- capacidad de usar simultáneamente varios agentes activos,
- posibilidad de recurrir a varios agentes, con vistas a aumentar todavía más la estabilización,
- estabilidad aumentada en medios acuosos, tanto simple como complejo (gel, detergente, emulsión).

ES 2 327 018 T3

Así, según una de sus características esenciales, la invención se refiere a unas composiciones que contienen por lo menos una enzima y por lo menos un agente destinado a evitar la degradación de dicha enzima encapsulada en el seno de unas vesículas multilamelares en forma de un apilamiento regular de bicapas concéntricas que comprenden por lo menos un agente tensoactivo, extendiéndose dichas bicapas desde el núcleo mismo de dichas vesículas hasta su periferia, y estando separadas por un líquido intersticial.

Mediante la expresión “estructura en cebolla” se entiende, tal como se ha expuesto anteriormente, una estructura multilamelar, en la que las vesículas de forma sustancialmente esférica están constituidas por una sucesión de bicapas concéntricas, desde el centro hasta la periferia de las vesículas, razón por la cual se usa el nombre de estructura en cebolla por analogía, para calificar dichas estructuras.

Estas estructuras se pueden demostrar mediante examen microscópico de las composiciones. La observación se realiza usando un microscopio óptico en luz polarizada, en el que es visible una fase lamelar, birrefringente. Se manifiesta mediante una textura característica, relacionada con la presencia de defectos (juntas de granos) entre los campos de fase orientados de forma diferente. En el caso de la fase concentrada de vesículas, la textura está caracterizada por su carácter uniforme y fino, relacionado con el tamaño de las vesículas. En la fase dispersada de vesículas, éstas son visibles en forma de puntos más o menos resueltos (en función del tamaño), ligeramente birrefringentes. La birrefringencia se observa sólo cuando la dispersión no está demasiado diluida. Por lo tanto, si la dispersión está relativamente diluida, habrá que proceder a una operación previa de concentración para demostrar claramente la birrefringencia característica de la presencia de las vesículas de estructura en cebolla.

El principio de la invención consiste en usar las vesículas como unos micro-recipientes que contienen la molécula (enzima) a proteger, y que impiden que se produzca la reacción de degradación. Para ello, el papel de la vesícula es doble: por un lado aislar la molécula activa de su entorno, y por otro lado aportar los aditivos necesarios para la estabilización, lo cual resulta particularmente interesante para las moléculas sensibles. Una de las ventajas principales de la vesícula es confinar la molécula frágil y su protección en un pequeño volumen, mucho menor que el volumen total de la preparación, y por lo tanto evitar así el efecto de dilución, permitiendo por ello el uso de una cantidad más baja de molécula protectora.

Según una variante ventajosa de la invención, las vesículas tienen unas dimensiones comprendidas entre 0,1 y 50 μm , preferentemente entre 0,2 y 10 μm .

Dichas estructuras se obtienen ventajosamente mediante la incorporación de la enzima y del agente destinado a estabilizarla en una fase lamelar cristal-líquido que comprende por lo menos un agente tensoactivo y después la transformación mediante la aplicación de un cizallado, de esta fase cristal-líquido lamelar en una fase densa de vesículas multilamelares de pequeño tamaño.

Este cizallado podrá ser un cizallado homogéneo, lo que presenta la ventaja de conducir a unas vesículas de tamaño perfectamente homogéneo. Sin embargo, una simple agitación mecánica podrá resultar suficiente para conducir a la formación de las vesículas multilamelares de la invención.

Según la patente francesa FR-2 689 418, esta transformación se puede realizar durante una etapa de cizallado homogéneo de la fase cristal-líquido, lo que conduce a unas vesículas o microcápsulas de tamaño controlado. Sin embargo, actuando sobre la formulación de la fase lamelar cristal-líquido, en particular sobre la naturaleza de los tensoactivos que entran en su composición, la transformación de esta fase cristal-líquido en vesículas se puede obtener mediante simple sollicitación mecánica, en particular durante la mezcla de los constituyentes.

Tal como se desprende en particular de los ejemplos ilustrativos de la invención, la elección de los agentes tensoactivos que se pueden utilizar para formar las membranas de las vesículas multilamelares de la invención es muy amplio. Sin embargo, se elegirán estos agentes tensoactivos en función del campo de uso de la composición prevista. En numerosos casos, la aplicación prevista comprende unas obligaciones que limitan la elección de los tensoactivos. Se trata frecuentemente de obligaciones legislativas o relacionadas con unas normas. Así, en el campo de la cosmética, el catálogo de la INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) proporciona la lista de los productos permitidos, en el caso de la agroalimentación se refiere a la lista positiva de los aditivos permitidos, o en el de la farmacia, a la farmacopea.

La formulación hace intervenir ventajosamente una mezcla de moléculas tensoactivas. Se usan generalmente por lo menos dos tensoactivos diferentes que tienen unos balances hidrófilo-lipófilo diferentes, lo que permite regular en continuo las propiedades de las bicapas y controlar así la aparición de la inestabilidad que dirige la formación de las vesículas multilamelares.

Según una variante particularmente ventajosa de la invención, se usará una mezcla de dos agentes tensoactivos denominados respectivamente agente tensoactivo lipófilo, que presenta un balance hidrófilo-lipófilo (HLB) comprendido entre 3 y 7, y agente tensoactivo hidrófilo, que presenta un HLB comprendido entre 8 y 15.

Según otra variante ventajosa de la invención, las membranas de las vesículas contienen por lo menos un agente tensoactivo polímero o un polímero que presenta unas propiedades anfífilas.

ES 2 327 018 T3

Es el caso, por ejemplo, de los poloxámeros, y otros derivados copolímeros del óxido de etileno y del óxido de propileno eventualmente modificados por adición de cadenas hidrófobas.

5 Se pueden citar a título de ejemplos no exhaustivos la familia de los Pluronic® y Lutrol® (BASF), los hidroxies-tearatos de polietileno (Solutol® de BASF o MYRJ® de ICI).

La invención se aplica en particular a unas enzimas sensibles a unas reacciones más específicas tales como la autoproteolisis en el caso de las proteasas.

10 Un campo en el que la invención encuentra unas aplicaciones particularmente interesantes es el de la cosmética y de la dermatología en los que numerosos agentes activos son conocidos por su fragilidad.

Otro campo en el que la invención encuentra una aplicación particularmente interesante es el de los medicamentos para los cuales las nociones de fragilidad de la molécula, y de limitación de los aditivos permitidos son todavía más
15 pertinentes que en la cosmética.

El agente destinado a estabilizar la enzima se elegirá en función de la naturaleza de esta enzima y del tipo de degradación que se busca evitar, teniendo en cuenta además el tipo de aplicación prevista.

20 Es el caso asimismo cuando el producto activo ve su estabilidad modificada por una variación de pH susceptible, por ejemplo, de provocar una reacción de hidrólisis o también de modificar el potencial redox del producto activo. Se elegirá entonces encapsular un agente estabilizante que permite modificar localmente el pH, de manera que se incrementa la estabilidad del producto activo.

25 Cuando se desea mejorar la estabilidad de un producto activo sensible a la oxidación, la vesícula contiene ventajosamente un producto conocido por sus propiedades antioxidantes debido a sus propiedades reductoras o debido a su acción para disminuir el riesgo de oxidación por efecto quelante, por ejemplo por efecto quelante de las trazas de iones metálicos catalizadores de la oxidación contenidos en el medio, o mediante la acción sobre el pH del medio cuando el potencial redox depende del pH.

30 Así, se citarán de manera no exhaustiva a título de agentes antioxidantes:

el ácido ascórbico y sus derivados,

35 el ácido cítrico y sus derivados (también usados como quelantes),

el ácido glutámico, los glutamatos y sus derivados,

40 el ácido etilen-diamina-tetraacético (EDTA) (quelante),

el ácido láctico y sus derivados (usado asimismo para ajustar el pH),

el ácido tártrico y sus derivados (usado asimismo para ajustar el pH y como agente quelante),

45 la benzofenona,

los bioflavonoides,

el butilhidroxi-hidroxianisol,

50 el butilhidroxi-hidroxitolueno,

el caroteno y sus derivados,

55 el clorobutanol,

los galatos de propilo, de octilo o de dodecilo,

el sulfito de sodio o de potasio, y los compuestos emparentados tales como el bisulfito o el piro-sulfito,

60 los tocoferoles (alfa, delta o gamma) y sus derivados,

de manera general todos los aditivos alimentarios de las clases E3xx y E22x de la clasificación europea de los aditivos alimentarios.

65

A título de ejemplo, la vitamina C y sus derivados son bien conocidos por su sensibilidad a la oxidación. Se ha demostrado claramente que se podía.

ES 2 327 018 T3

El agente destinado a estabilizar el producto activo puede pertenecer asimismo a la membrana de la vesícula, si tiene propiedades anfífilas.

5 Existen casos en los que el agente estabilizante desempeñará asimismo la función de agente tensoactivo que participa en la formulación de las membranas de las vesículas. Dichos ejemplos se proporcionarán más adelante en relación con la estabilización de las enzimas.

10 Se usará como agente estabilizante, de manera general, o bien un aditivo conocido por estabilizar o proteger las proteínas, designado a continuación como aditivo protector no específico de las enzimas, o bien un agente específico destinado a estabilizar específicamente una enzima.

Así, en el caso de las proteasas, un inhibidor de proteasas permitirá evitar la autoproteólisis.

15 Según una primera variante, en la que se usa un aditivo protector no específico, éste se selecciona ventajosamente de entre los productos conocidos por actuar sobre la conformación de la enzima. A título de ejemplo de dichos productos, se citarán en particular unos iones cuyo efecto es aumentar la fuerza iónica y fijarse sobre ciertos sitios cargados de la enzima o de las moléculas susceptibles de empezar unas uniones débiles con la proteína.

20 El experto en la materia comprenderá fácilmente que los iones más eficaces son los iones relativamente grandes, por ejemplo unos iones amonios y amonios cuaternarios en lo que se refiere a los cationes y unos sulfatos, fosfatos, carboxilatos y poliácidos carboxílicos en lo que se refiere a los aniones. El experto en la materia comprenderá fácilmente que su elección para obtener la mejor eficacia deberá referirse a unos iones suficientemente grandes o ligados a una molécula suficientemente grande.

25 Entre los iones particularmente interesantes para estabilizar las enzimas, se citarán el ión calcio muy conocido por intervenir específicamente en la reactividad de muchas enzimas, en particular de las proteasas.

30 En la variante según la cual se usan unas moléculas específicas estabilizadoras, se elegirán ventajosamente unas moléculas que se refieren a unas funciones susceptibles de unirse a la enzima, por ejemplo unas moléculas que tienen la posibilidad de formar unas uniones hidrógenos con la enzima. Entre estas moléculas, se citarán en particular los alcoholes y los polioles, ventajosamente unos polioles asociados a un derivado del boro, en particular a un ión borato, unas aminas etoxiladas y unos óxidos de aminas. Se podrá asimismo elegir recurrir a unos tensoactivos que comprenden varios óxidos de etileno. Dichos tensoactivos entrarán en la formulación de las membranas de las vesículas de la invención y participarán en la estabilización de las enzimas.

35 Por lo tanto, se podrán citar a título de agentes destinados a estabilizar unas enzimas incorporadas en el seno de estas vesículas, unos tensoactivos y unas moléculas anfífilas que contienen las funciones siguientes o sustituidas por los grupos siguientes:

- 40 • amonios cuaternarios,
- aminas y etanolamina,
- 45 • moléculas que contienen una función fosfato, en particular fosfolipídicas
- sales y ésteres de ácidos grasos,
- sales de poliácidos,
- 50 • alcoholes,
- glicerol y sus ésteres (los glicéridos),
- 55 • polioles (poliglicéridos, polietilenglicol, polipropilenglicol),
- azúcares (sorbitol, glucosa, lactosa, sacarosa, etc.).

60 Los agentes estabilizantes de las enzimas se seleccionarán ventajosamente de entre los derivados polímeros que contienen unas funciones de uno de los tipos anteriores, en particular:

- ◇ los polisacáridos modificados o no tales como:
- 65 * agarosa,

ES 2 327 018 T3

- * goma de guar,
- * carragenanos,
- 5 * ácido algínico y alginato,
- * pectina,
- * quitosano,
- 10 ◇ las polivinilpirrolidonas, eventualmente sustituidas,
- ◇ las celulosas y derivados de celulosas (alquiladas o funcionalizadas),
- 15 ◇ los poliacrilatos,
- ◇ los polivinilalcoholes (PVA) y los derivados parcialmente hidrolizados de los polivinilacetatos,
- ◇ las poliacrilamidas,
- 20 ◇ las poliamidas.

Los ensayos realizados por los inventores de la presente invención demuestran que la presencia en las vesículas multilamelares que incorporan una enzima, como agente destinado a evitar la degradación de dicha enzima, o bien de un tensoactivo o de una molécula anfifílica que presenta por lo menos una función nitrogenada, o bien de un polímero que presenta asimismo una función nitrogenada, permite mejorar considerablemente la estabilización de la enzima.

30 Cuando se recurre como agente de estabilización de una enzima a un agente tensoactivo que comprende por lo menos una función nitrogenada, se elegirá preferentemente un agente tensoactivo, en el que la función nitrogenada pertenece a la cabeza polar de dicho agente tensoactivo.

Según esta variante en la que las funciones nitrogenadas pertenecen a la cabeza polar del tensoactivo, la cola hidrófoba está ventajosamente constituida por una o varias cadenas carbonadas. Se puede definir por lo tanto independientemente la naturaleza de la parte hidrófoba que no varía mucho de un tensoactivo a otro: por lo menos una (dos en general) cadena alquilo de 1 a 22 carbonos, lineal o ramificada, simple o sustituida, eventualmente que contiene un residuo cíclico o aromático, saturada o que contiene una o varias insaturaciones, eventualmente sustituida por otras funciones. La o las cadenas que forman la parte hidrófoba del agente tensoactivo pueden estar o bien directamente unidas al átomo de nitrógeno de la función nitrogenada, o bien, llegado el caso, unidas a uno de los sustituyentes del nitrógeno.

Cuando se recurre, para estabilizar una enzima, al uso de un polímero que contiene por lo menos una función nitrogenada, se seleccionará ventajosamente de entre la lista siguiente:

- 45 - poliacrilamidas y productos de polimerización o de copolimerización de los derivados de la acrilamida,
- derivados amidados de polisacáridos en particular gomas de guar cuaternizadas tales como el cloruro de guar hidroxipropiltrimonio.
- 50 - derivados de la quitina tales como quitosano, sales de poli D-glucosamina, pudiendo los contra-iones de estos polímeros contener una función amina o derivada (glutamato, por ejemplo),
- poliamidas.

55 En el caso específico en el que se busca estabilizar una enzima evitando su autoproteólisis, se co-encapsula ventajosamente un inhibidor de proteasa, por ejemplo el EDTA, el fenilmetanosulfonilfluoruro, la 3,4-dicloroisocumarina, la quimostatina.

60 Con el fin de reforzar la función de confinamiento desempeñada por la vesícula, puede ser ventajoso añadir en su formulación uno o unos polímeros o moléculas de alto punto de fusión, que reforzarán la estanqueidad de la vesícula. Este refuerzo de estanqueidad se puede obtener asimismo mediante cualquier medio que permite disminuir el intercambio con el medio de dispersión final, en particular envolviendo la vesícula con un polímero o una cera, eventualmente una cera autoemulsificable. Así, la invención se refiere asimismo según una variante ventajosa a unas composiciones en las que las vesículas comprenden además por lo menos un agente destinado a reforzar su estanqueidad, siendo este agente encapsulado en unas vesículas o constituyendo un revestimiento externo de estas mismas vesículas.

ES 2 327 018 T3

Según una variante particularmente ventajosa de la invención, se podrá elegir como agente destinado a estabilizar el producto activo un agente que mejora simultáneamente la estanqueidad de la vesícula.

5 En resumen, la invención consiste en usar la microvesícula multilamelar como un medio de confinamiento de una enzima y unos aditivos que permiten su estabilización, eventualmente reforzando su estanqueidad.

Según otro de sus aspectos, la invención se refiere asimismo al procedimiento de preparación de una composición tal como la definida anteriormente, que comprende las etapas siguientes:

- 10 - preparar una fase lamelar cristal-líquido que comprende por lo menos un agente tensoactivo y que incorpora por lo menos una enzima y un agente destinado a evitar la degradación de dicho agente activo,
- 15 - transformar dicha fase cristal-líquido en vesículas multilamelares de estructura en cebolla, mediante cizallado o sollicitación mecánica, en particular mediante la mezcla de los constituyentes de dicha fase lamelar cristal-líquido.

Este cizallado será ventajosamente un cizallado homogéneo tal como se enseña en la patente FR 2 689 418.

20 La transformación de la fase lamelar cristal-líquido en vesículas multilamelares de estructura en cebolla podrá ser facilitada actuando sobre la elección de los tensoactivos. Se podrá, en particular, elegir como se ha indicado anteriormente un tensoactivo que presenta un alto HLB y un agente tensoactivo que presenta un bajo HLB.

25 Por otro lado, ciertos tensoactivos están particularmente adaptados para favorecer esta transformación. Así, es el caso, por ejemplo, de los poloxámeros, y otros derivados copolímeros del óxido de etileno y del óxido de propileno eventualmente modificados por adición de cadenas hidrófobas. Estos compuestos son particularmente interesantes puesto que aportan al mismo tiempo la adaptación de las propiedades elásticas de la membrana de tensoactivos y su estabilización por efecto estérico. Se pueden citar a título de ejemplos no exhaustivos la familia de los Pluronic® y Lutrol® (BASF), los hidroxistearatos de polietileno (Solutol® de BASF o MYRJ® de ICI).

30

Por último, según un último aspecto, la invención se refiere asimismo a un procedimiento para mejorar la estabilidad de un producto activo y evitar su degradación, caracterizado porque consiste en encapsular dicho producto activo en el seno de unas vesículas multilamelares tales como las definidas anteriormente, que presentan una estructura en cebolla y constituidas, desde su periferia hasta su centro, por membranas en forma de bicapas concéntricas que comprenden por lo menos un agente tensoactivo, estando dichas membranas separadas por un líquido intersticial, incorporando dichas vesículas en su seno por lo menos un agente destinado a evitar la degradación de dicho producto activo.

35

Por las razones expuestas anteriormente, la invención encuentra una aplicación particularmente interesante en la estabilización y/o la inmovilización de las enzimas.

40

Así, la invención se refiere más particularmente a un procedimiento para proteger y/o inmovilizar una enzima según el cual se encapsula dicha enzima en el seno de las vesículas multilamelares de estructura en cebolla tales como las definidas anteriormente, conteniendo dichas vesículas en su seno por lo menos un agente tal como el definido anteriormente destinado a evitar la degradación de dicha enzima.

45

Los excelentes resultados obtenidos en lo que se refiere a la estabilización de una enzima, cuando ésta se encuentra incorporada en el seno de una vesícula multilamelar que comprende por lo menos un agente estabilizante seleccionado de entre los tensoactivos, las moléculas anfífilas y los polímeros, que contiene por lo menos una función susceptible de unirse a dicha enzima, han estando claramente relacionados con la existencia de una unión por la cual la enzima se encuentra de alguna forma complejada a uno de los constituyentes de las membranas de la vesícula. Estos resultados han sugerido que una interacción del mismo tipo podría producirse entre la superficie de una vesícula multilamelar que incorpora en sus membranas dicho agente estabilizante. Esta hipótesis se ha podido confirmar porque se ha podido constatar asimismo un claro efecto de estabilización de una enzima cuando ésta se encuentra en contacto en el seno de una composición con unas vesículas multilamelares de estructura en cebolla cuya formulación es tal que sus membranas comprenden por lo menos un producto estabilizante seleccionado de entre las moléculas anfífilas, los tensoactivos y los polímeros, que contienen por lo menos una función susceptible de unirse a dicha enzima.

50

55

Por lo tanto, según otro aspecto de la presente invención, se refiere asimismo a un procedimiento para proteger y/o inmovilizar una enzima según la cual se pone dicha enzima en presencia de vesículas multilamelares de estructura en cebolla, es decir, de vesículas constituidas, desde su periferia hasta su centro, por membranas en forma de bicapas concéntricas que comprenden por lo menos un agente tensoactivo, estando dichas membranas separadas por un líquido intersticial, incorporando dichas vesículas en su seno por lo menos un compuesto denominado agente estabilizante, que contiene por lo menos una función susceptible de unirse a dicha enzima. Este agente estabilizante se selecciona de entre las moléculas anfífilas, los tensoactivos y los polímeros citados anteriormente como agente que tiene un efecto estabilizante sobre una enzima encapsulada.

60

65

ES 2 327 018 T3

Los ejemplos siguientes proporcionados a título puramente ilustrativo de la invención muestran cómo ha sido posible según la invención mejorar la estabilidad de diferentes activos supuestamente frágiles.

Estos ejemplos se refieren asimismo a las figuras 1 y 2:

- la figura 1, proporcionada haciendo referencia al ejemplo 1, ilustra la estabilización de la tripsina por encapsulación en unas vesículas multilamelares de estructura en cebolla que contienen, a título de agente estabilizante, un agente tensoactivo que contiene una función amonio;

- la figura 2, proporcionada haciendo referencia al ejemplo 2, ilustra la estabilización de la tripsina por encapsulación en una vesícula multilamelar de estructura en cebolla que incorpora un tensoactivo de la familia de los ésteres cuaternarios.

Ejemplos

En los ejemplos siguientes, salvo que se indique lo contrario, las proporciones son en porcentajes en peso.

Ejemplo 1

Estabilización de una enzima mediante encapsulación en una vesícula que contiene un tensoactivo que contiene una función amonio

1) Principio del ensayo de demostración de la estabilización de las enzimas

Para demostrar el efecto de estabilización en las enzimas, se mide la actividad de una enzima encapsulada en función del tiempo de envejecimiento, por comparación con la enzima simplemente puesta en disolución en las mismas condiciones de envejecimiento. Siendo la enzima encapsulada inaccesible, es necesario liberarla previamente para poder medir su actividad. El experimento comprende por lo tanto cuatro etapas:

- preparar las muestras
 - * encapsular la enzima y dispersar unas vesículas que contienen la enzima
 - * disolver a la misma concentración que la enzima de control
 - * envejecer la dispersión de vesículas y la disolución de control
 - * liberar la enzima de las vesículas
 - * medir la actividad enzimática de la muestra ensayada y de la muestra de control.

La actividad enzimática se evalúa mediante un método clásico de seguimiento de la reacción de degradación de un sustrato característico de la enzima.

2) Condiciones del ensayo

a) Enzima

La enzima usada es la tripsina, que es una serina proteasa (como las proteasas usadas en los detergentes). Su masa es de 23.000 g/mol y su tamaño está comprendido entre 20 y 40 Å (entre 20 y 40.10⁻¹⁰ m).

Acondicionada en forma liofilizada, se solubiliza en un tampón en forma de una disolución al 4% en masa. Esta disolución al 4% se usa en las preparaciones.

Para las mediciones, las muestras de control se preparan tomando 50 µl (50 mg) de esta disolución para 5 g de disolución final, es decir, un contenido en enzima en la disolución final de 0,04% en masa.

b) Vesículas

El contenido másico de enzima en las vesículas es de 0,15%. Salvo que se indique lo contrario, las vesículas se preparan mediante el mezclado a temperatura ambiente de los tensoactivos y después la incorporación de la disolución acuosa de enzima. Se obtiene así una pasta viscosa, de textura birrefringente característica (observación al microscopio óptico en luz polarizada). Esta pasta se dispersa mediante la adición lenta de agua con agitación a temperatura ambiente.

ES 2 327 018 T3

Para las mediciones de la actividad, todas las dispersiones de vesículas tienen un contenido de 2% de vesículas. El contenido de enzima de la dispersión de vesículas es por lo tanto de 0,04%.

c) *Tampón*

5

Es un tampón fosfato de composición:

NaCl: 8 g/l

10

KCl: 0,2 g/l

Na₂HPO₄: 1,15 g/l

KH₂PO₄: 0,2 g/l

15

El pH está comprendido entre 7,5 y 8.

d) *Sustrato*

20

Se usa como sustrato el N-benzoil-L-arginil-etil-éster (BAEE) que es un sustrato usado habitualmente para estudiar la actividad de la tripsina en la medida en la que se sabe que su descomposición es catalizada por la tripsina. El producto de reacción absorbe en el UV.

e) *Medición de la actividad*

25

Se realiza de la siguiente manera:

e1. *Destrucción de las vesículas:*

30

Se extraen 25 μ l de muestra y se añaden 20 μ l de disolución de tritón X100 (Sigma) al 10%. Se deja actuar durante aproximadamente 30 segundos.

e2. *Medición de la actividad enzimática:*

35

Se extraen 37 μ l de disolución de sustrato a 0,024 moles/l, se añaden 950 μ l de tampón y 22,5 μ l de muestra. Se sigue la cinética durante 10 minutos a una longitud de onda de 253 nm y a 20°C.

El envejecimiento de las muestras se efectúa en estufa, a la temperatura de 37°C.

40

3) *Formulación ensayada*

Agentes tensoactivos usados:

45

Polisorbato 60: Polioxietileno (20) sorbitán monoestearato.

DODMAB: bromuro de dimetildioctadecilamonio.

Formulación:

50

- 15% de disolución acuosa de enzima.
 - 35% de agua.
- 55
- 25% de DODMAB.
 - 25% de polisorbato 60.

60

Preparación:

Los tensoactivos y la disolución de enzima se mezclan groseramente a temperatura ambiente, y después la mezcla se introduce en una célula de tipo Couette procediendo según la patente WO 93/19735.

65

El cizallado se realiza a 25°C durante 20 minutos, a un índice comprendido entre 50 y 100 s⁻¹.

ES 2 327 018 T3

4) Resultados

La degradación de la enzima se sigue mediante espectroscopía UV.

5 La figura 1 representa las variaciones de la actividad enzimática durante el tiempo para la enzima encapsulada, en comparación con las variaciones observadas para la enzima libre. La actividad inicial se fija arbitrariamente en 100 para el trazado de la curva.

La figura 1 demuestra claramente la estabilización de la enzima debido a su encapsulación.

10

Ejemplo 2

Estabilización de una enzima mediante encapsulación en una vesícula que contiene un éster cuaternario

15

Se procede como en el ejemplo 1. El tensoactivo usado en este ejemplo pertenece a la familia de los ésteres cuaternarios. Se trata del: N,N-di("acil" oxi-2-etil), N-hidroxi-2-etilo, metosulfato de N-metil-amonio, en disolución en el isopropanol comercializado por CECA con la marca Noxamium 920.

20 Formulación (en porcentaje en peso)

Disolución acuosa de enzima 15%

25 Agua 35%

Noxamium 920 50%

30 Preparación

La preparación de las vesículas es análoga a la del ejemplo 1.

35 La figura 2 representa las variaciones de la actividad enzimática a lo largo del tiempo para la enzima encapsulada en comparación con las variaciones observadas para la enzima libre. La actividad inicial está arbitrariamente fijada en 100.

Esta figura demuestra claramente la estabilización de la enzima debido a su encapsulación.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Composición que contiene por lo menos una enzima y por lo menos un agente destinado a evitar la degradación de dicha enzima encapsulada en el seno de vesículas multilamelares en forma de un apilamiento regular de bicapas concéntricas que comprenden por lo menos un agente tensoactivo, extendiéndose dichas bicapas desde el núcleo mismo de dichas vesículas hasta su periferia y estando separadas por un líquido intersticial.

10 2. Composición según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dichas vesículas tienen unas dimensiones comprendidas entre 0,1 y 50 μm , preferentemente entre 0,2 y 10 μm .

15 3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque las bicapas de dichas vesículas comprenden una mezcla de dos agentes tensoactivos denominados respectivamente agente tensoactivo lipófilo, que presenta un balance hidrófilo-lipófilo (HLB) comprendido entre 3 y 7, y agente tensoactivo hidrófilo, que presenta un HLB comprendido entre 8 y 15.

4. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque las bicapas de las vesículas contienen por lo menos un agente tensoactivo polímero o un polímero que presenta unas propiedades anfífilas.

20 5. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque dicho agente destinado a evitar la degradación de dicha enzima es un agente estabilizante conocido por estabilizar las proteínas, actuando sobre la conformación de la enzima, en particular un ión, por ejemplo un ión calcio.

25 6. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque dicho agente estabilizante es un agente que contiene unas funciones susceptibles de unirse a dicha enzima.

7. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada** porque dicho agente destinado a estabilizar dicha enzima se selecciona de entre los agentes tensoactivos y las moléculas anfífilas que contienen las funciones siguientes o sustituidas por los grupos siguientes:

- 30 • amonios cuaternarios,
- aminas y etanolamina,
- 35 • moléculas que contienen una función fosfato, en particular fosfolipídicas,
- sales y ésteres de ácidos grasos,
- sales de poliácidos,
- 40 • alcoholes,
- glicerol y sus ésteres (los glicéridos),
- 45 • polioles tales como poliglicéridos, polietilenglicol, y polipropilenglicol,
- azúcares tales como sorbitol, glucosa, lactosa, y sacarosa.

50 8. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada** porque dicho agente destinado a estabilizar dicha enzima es un polímero, seleccionado de entre el grupo constituido por:

- los polisacáridos modificados o no tales como la agarosa, la goma de guar, los carragenanos, el ácido algínico y los alginatos, la pectina, el quitosano,
- 55 - las polivinilpirrolidonas, eventualmente sustituidas,
- celulosa y derivados de celulosa tal como los derivados alquilados o funcionalizados,
- 60 - los poliacrilatos,
- los polivinilalcoholes (PVA) y los derivados parcialmente hidrolizados de los polivinilacetatos,
- las poliacrilamidas,
- 65 - las poliamidas.

ES 2 327 018 T3

9. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada** porque dicho agente destinado a evitar la degradación de dicha enzima es un componente que comprende por lo menos una función nitrogenada, en particular un agente tensoactivo o un polímero.

5 10. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada** porque dicho agente destinado a evitar la degradación de dicho agente activo presenta un carácter anfífilo que le confiere una función activa en la formulación de las bicapas de dichas vesículas.

10 11. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizada** porque dichas vesículas comprenden además por lo menos un agente destinado a reforzar su hermetismo, siendo dicho agente encapsulado en el seno de dichas vesículas o constituyendo un revestimiento externo de dichas vesículas.

15 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizada** porque dicha enzima es una proteasa.

13. Procedimiento de preparación de una composición según una de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:

- 20 - preparar una fase lamelar cristal-líquido que comprende por lo menos un agente tensoactivo y que incorpora por lo menos una enzima y un agente destinado a evitar la degradación de dicho agente activo,
- transformar dicha fase cristal-líquido en vesículas multilamelares de estructura en cebolla, mediante cizallado o sollicitación mecánica, en particular mediante la mezcla de los constituyentes de dicha fase lamelar cristal-líquido.

25 14. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado** porque dicho cizallado es un cizallado homogéneo.

30 15. Procedimiento para mejorar la estabilidad de una enzima y evitar su degradación, **caracterizado** porque consiste en encapsular dicha enzima en el seno de vesículas multilamelares tales como las definidas en una de las reivindicaciones 1 a 12 u obtenidas según el procedimiento de una de las reivindicaciones 13 ó 14, estando dichas vesículas en forma de un apilamiento regular de bicapas concéntricas que comprenden por lo menos un agente tensoactivo, extendiéndose dichas bicapas desde el núcleo mismo de dichas vesículas hasta su periferia y estando separadas por un líquido intersticial, incorporando dichas vesículas en su seno por lo menos un agente destinado a evitar la degradación de dicha enzima.

35 16. Procedimiento para proteger y/o inmovilizar una enzima, **caracterizado** porque consiste en poner dicha enzima en presencia de vesículas multilamelares en forma de un apilamiento regular de bicapas concéntricas que comprenden por lo menos un agente tensoactivo, extendiéndose dichas bicapas desde el núcleo mismo de dichas vesículas hasta su periferia y estando separadas por un líquido intersticial, incorporando dichas vesículas en su seno por lo menos un agente destinado a evitar la degradación de dicha enzima tal como se define en una de las reivindicaciones 5 a 10 o en encapsular dicha enzima en el seno de vesículas multilamelares tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 11 u obtenidas según el procedimiento de una de las reivindicaciones 14 ó 15, incorporando dichas vesículas en su seno por lo menos un agente destinado a evitar la degradación de dicha enzima tal como se define en una de las reivindicaciones 5 a 10.

45 17. Procedimiento según la reivindicación 15 ó 16, **caracterizado** porque dicha enzima es una proteasa.

50

55

60

65

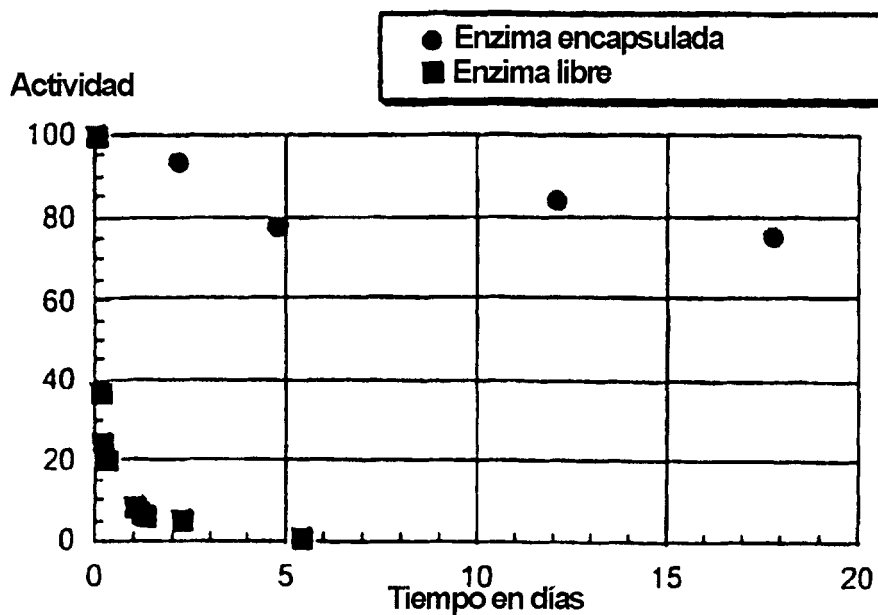


FIG. 1

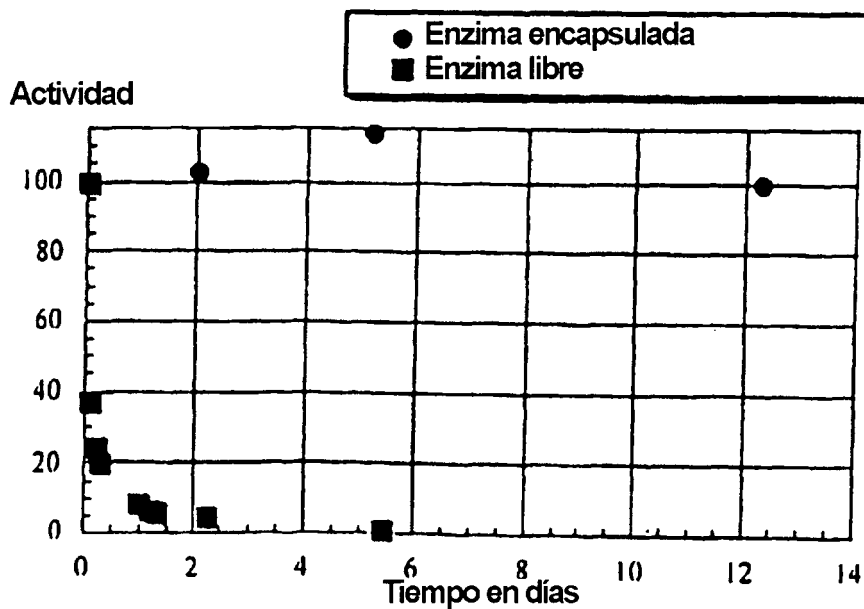


FIG. 2