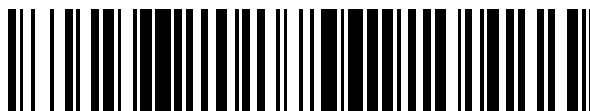


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 828**

51 Int. Cl.:

A61K 36/48 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2010** **E 10763851 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015** **EP 2611454**

54 Título: **Preparación aplicable por vía peroral que contiene histaminasa de origen vegetal, resistente a pepsina y tripsina y un procedimiento para producirla**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2015

73 Titular/es:

**NATURLAND MAGYARORSZÁG TERMELŐ ÉS
KERESKEDELMI KFT. (100.0%)
Csillagvirág u. 8
1106 Budapest, HU**

72 Inventor/es:

**SIPKA, SÁNDOR;
GYÖRY, ZOLTÁN;
BORBÉLY, JÁNOSNÉ;
KERESZTES, TAMÁS;
VÁRNAI, PÉTER y
BÍRÓ, TAMÁS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 540 828 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

Preparación aplicable por vía peroral que contiene histaminasa de origen vegetal, resistente a pepsina y tripsina y un procedimiento para producirla.

- 5 La invención se refiere a una preparación aplicable por vía peroral que contiene histaminasa de origen vegetal resistente a pepsina y tripsina y un procedimiento para producirla.

10 La preparación según la invención se puede dosificar por vía peroral para mejorar la digestión, reducir el apetito, así como para el fin de reducción de peso. La preparación es estructuralmente resistente a la tripsina, que actúa en el duodeno, y también se protege contra la pepsina, la enzima que descompone proteína del estómago. La preparación se puede aplicar con una alta eficacia, ya que la enzima permanece activa durante un largo tiempo en el intestino para descomponer la histamina, produciendo efectos secundarios desagradables relacionados con la alimentación.

En circunstancias naturales, la histamina se descompone principalmente por histaminasa en el duodeno producida por el páncreas mientras está entrando también pepsina en el duodeno del estómago.

La pepsina que entra en el duodeno puede descomponer la histaminasa hasta una cierta extensión y reduce su actividad.

- 15 Este hecho produce un gran problema para mucha gente que padece de una "intolerancia a la histamina" o "hiperacidez" producida por el alto nivel de histamina.

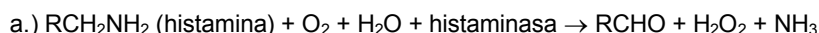
La "intolerancia a la histamina" es un estado patológico que surge sobre la base de la cantidad de histamina aumentada en el sistema digestivo y/o la capacidad reducida para descomponerla, lo que con frecuencia va acompañado de hiperacidez o abundante producción de ácido gástrico.

- 20 La histamina es un tipo importante de aminas biogénicas con un gran número de efectos biológicos fuertes.

Es, entre otros, uno de los agentes más activos que aumenta la producción de jugo gástrico y la sensación de hambre que mejora el apetito.

En personas sanas, la histamina se descompone rápidamente por "histaminasa" denominada bioquímicamente enzima diamino oxidasa (DAO, por sus siglas en inglés) que es también un componente natural del jugo intestinal.

- 25 La descomposición natural de la histamina tiene lugar en el intestino delgado de acuerdo con las siguientes reacciones químicas:



- 30 Cuando la actividad de DAO es baja o su cantidad es pequeña, puede tener lugar una denominada "intoxicación por histamina" acompañada de síntomas serios y desagradables. La histamina se produce de manera continua en diferentes órganos y es el mediador de diversos síntomas desagradables en el organismo.

35 Hay productos alimenticios ricos en histamina (por ejemplo, tipos de queso, tipos de pescado, embutidos, etc.) y bebidas alcohólicas (en particular algunos tipos de vino tinto) o fármacos que inhiben la actividad de DAO (fármacos antiflogísticos, analgésicos, etc.) o productos alimenticios que provocan la liberación de histamina (zumo de limón, tomate, chocolate, algunas comidas para peces, licores, especias, etc.) que producen diarrea, dolor de cabeza, conjuntivitis, rinitis, reducción de la presión sanguínea, trastornos del ritmo cardíaco, eritema y picazón acompañado de "ardor de estómago" (Maintz L. y Novak N. Histamine and histamine intolerance. Amer J Clin Nutr 2.007; 5. pág. 1.185-1.196).

- 40 Hay aproximadamente 1% de la población que padece de intolerancia a la histamina, 80% de ellos es de mediana edad. Esta proporción puede afectar a aproximadamente 100.000 personas en Hungría, 5 millones de personas en Europa y 60 millones de personas en todo el mundo.

Para reducir los desagradables síntomas producidos por la intolerancia a la histamina, hay la posibilidad de introducir enzima histaminasa (DAO) por vía peroral en el tracto intestinal principalmente para descomponer la histamina que entra en el intestino delgado junto con la comida o que es inducida por la comida.

- 45 Anteriormente ya se trató de aplicar cápsulas conteniendo enzima histaminasa de origen animal extraída de riñón de cerdo.

Esta preparación contenía enzima histaminasa de origen animal y agentes estabilizantes. Sin embargo, la preparación no tuvo una aplicación extendida (Lorenz W, Ennis M, Doenicke A, Dick W.: Perioperative uses of histamine antagonists. J Clin Anesth 1.990; 2: 345-60).

De manera similar a las otras DAO de origen mamífero, esta enzima histaminasa de origen animal es también una molécula dimerizada que consiste en dos cadenas de 90 kilodalton cada una y tiene el peso molecular total de 180 kD, es resistente a la tripsina pero sensible a la pepsina.

La pepsina la divide en trozos con una alta actividad.

- 5 Se observó que la pepsina divide las enzimas DAO de origen animal en una alta extensión (Houen G, Jorgensen J, Leonardsen L, Larsson LI.: Purification and partial characterization of mammalian Cu-dependent amine oxidases. Acta Chem Scand 1.993: 47: 902-909; Kleutz MD, Adamsons K, Flynn JE Jr. Optimized preparation and determination of pea seedling amine oxidase. Prep Biochem 10: 615-631; McGuirl MA, McCahon CD, McKeown KA, Dooley DM.: Purification and characterization of pea seedling amine oxidase for crystallization studies. Plant Physiol 1.994; 106: 1.205-1.211).

La descripción de la patente europea EP 1339422 describe una aplicación de la histaminasa de origen vegetal purificada por fraccionamiento para el tratamiento de choques alérgicos y septicémicos.

La histaminasa es producida a partir de la planta del guisante (*Pisum sativum* L.) o de plantas de *Lens Culinaris*, *Cicer arietinum*, *Latirus sativus* por extracción después por la purificación de los extractos.

- 15 La preparación se administra en las formas de inyección o se administra pulverizada en sangre, abdomen, tráquea o bronquios.

Durante nuestros experimentos, sin embargo, experimentamos que la preparación no se puede aplicar por vía peroral, debido a que la pepsina la descompone en el estómago o en el duodeno, así llega a ser ineficaz o su efecto es muy pequeño.

- 20 También se encontró durante los experimentos que la aplicación frecuente de la preparación en la sangre o en las vías respiratorias puede producir reacciones inmunitarias desagradables.

- 25 Se reconoce que el jugo vegetal prensado obtenido de los brotes del guisante (*Pisum sativum* L.), lenteja (*Lens culinaris*); garbanzo (*Cicer arietinum*); almorta (*Latirus sativus*); judía (*Phaseolus vulgaris*) o haba panosa (*Vicia fava*) o de una mezcla de brotes de las plantas mencionadas por prensado no sólo contiene histaminasa (DAO) de origen vegetal, resistente a la tripsina, sino que contiene también catalasa y una sustancia inhibidora de la proteasa (pepsina), también.

La preparación según la invención mantiene su capacidad de descomposición de histamina casi totalmente incluso en presencia de pepsina y mantiene continuamente este efecto en el tracto alimentario total, también.

- 30 El objeto de esta invención es una preparación aplicable por vía peroral de origen vegetal, resistente a la pepsina y tripsina, basada en histaminasa, opcionalmente para el uso como agente para mejorar la digestión, reducir el apetito o reducir el peso corporal. Las características de la preparación de acuerdo con la invención son como sigue, es un jugo prensado - que está opcionalmente en forma liofilizada - obtenido de plántulas de guisante (*Pisum sativum* L.), lenteja (*Lens culinaris*), garbanzo (*Cicer arietinum*), almorta (*Latirus sativus*), judía (*Phaseolus vulgaris*) o haba panosa (*Vicia fava*) o - de una mezcla de plántulas de las plantas ya mencionadas que contiene histaminasa, catalasa e inhibidor de proteasa.

La preparación contiene 0,1 a 2,5% en masa de histaminasa, 0,1 a 2,5 % en masa de catalasa y 0,5 a 3,2 % en masa de inhibidor de proteasa calculado para sustancia seca. La preparación de acuerdo con la invención también se puede aplicar como un producto para mejorar la digestión, un producto para reducir el apetito, así como un producto para reducir el peso.

- 40 El objeto también de la invención es la producción de la preparación anterior.

- 45 La preparación de la invención se produce de tal manera que las semillas de guisante (*Pisum sativum* L.), lenteja (*Lens culinaris*); garbanzo (*Cicer arietinum*), almorta (*Latirus sativus*), judía (*Phaseolus vulgaris*) o haba panosa (*Vicia fava*) o una mezcla de las semillas de las plantas ya mencionadas se seleccionan, se desinfectan, se remojan en agua, se las deja después brotar, después se separan las plántulas, se refrigeran los brotes a una temperatura entre -10°C y -20°C, se deja que permanezcan a esta temperatura, después se deja que se calienten hasta 4 a 10°C, se prensa el material, se separa el jugo prensado y opcionalmente se liofiliza.

Es ventajoso tomarla diariamente al menos en la dosis de 0,2 mg/kg de peso corporal como preparación de complemento alimenticio (calculado para sustancia seca).

- 50 Durante nuestros experimentos, se determinó la masa molecular de la histaminasa que está presente en el jugo prensado preparado a partir de los brotes de las plantas ya mencionadas.

Es aproximadamente $2 \times 75 = 150$ kD que indica que esta molécula de origen vegetal presenta una estructura diferente de la de DAO de origen mamífero con la masa molecular de $2 \times 90 = 180$ kD.

La masa molecular de la catalasa que está presente en el jugo prensado es $4 \times 57 = 228$ kD.

El jugo prensado de acuerdo con la invención, así como su producto liofilizado son preparaciones, adecuadas para administración peroral en las siguientes formas: a) como cápsulas enterodisolventes (disueltas en el intestino delgado), b) como un polvo (comprimido) aplicado directamente al estómago debido a su resistencia a la pepsina. Así, se puede usar más ventajosamente y económicamente que todas las preparaciones conocidas de orígenes animal o vegetal para descomponer la histamina y reducir la intolerancia a la histamina acompañada con frecuencia de hiperacidez, además, para reducir el apetito aumentado y el sobrepeso.

Se ha señalado la preparación de acuerdo con la invención como "PTRNH".

El procedimiento de descomposición de la histamina tiene lugar en presencia de PTRNH en el estómago o en el duodeno de la siguiente manera:

a.) RCH_2NH_2 (histamina) + O_2 + H_2O + PTRNH (componente DAO) $\rightarrow$ RCHO + H_2O_2 + NH_3

b.) $2\text{H}_2\text{O}_2$ + PTRNH (componente catalasa) $\rightarrow$ $2\text{H}_2\text{O}$ + O_2

Como está teniendo lugar el principal proceso de digestión de los alimentos que contienen histamina en el intestino delgado y también tiene lugar aquí la liberación de histamina de ellos, aunque una parte menor de la histamina ya se libera en el estómago, la reducción del nivel de histamina se puede conseguir por la administración oral de las cápsulas o comprimidos disueltos en el estómago o en el intestino delgado o por el jugo prensado que contiene PTRNH de acuerdo con la invención administrados inmediatamente por vía peroral.

La preparación de acuerdo con la invención no sólo es resistente a la tripsina que está presente en el intestino delgado sino también a la pepsina que está presente en el estómago o que entra en el intestino delgado, también.

Se reconoce que nuestra preparación que se administra por vía peroral es más eficaz que cualquier otra preparación de histaminasa administrada por vía peroral de orígenes animal o vegetal para descomponer la histamina en el sistema digestivo producida por diferentes razones y que tiene efectos secundarios desagradables incluso por esa razón de que contiene también componentes de catalasa e inhibidor de la proteasa (inhibidor de pepsina) en paralelo a histaminasa resistente a tripsina debido a su naturaleza original.

Se sabe que la histamina producida en el intestino delgado es también un estímulo natural para la producción de ácido gástrico.

La reducción en su cantidad, da como resultado una producción reducida de ácido gástrico y una sensación disminuida de hambre, lo que existiendo durante un periodo más prolongado, puede inhibir la ganancia de peso corporal o puede dar como resultado una pérdida de peso corporal.

Se introduce la preparación de acuerdo con la invención y su producción a continuación.

Ejemplo 1

Producción de PTRNH

A.) La germinación.

Las semillas de cualquier variedad de guisante (*Pisum sativum*) para siembra de primavera o aquellas para siembra de invierno son aplicables principalmente para germinación pero también se pueden usar semillas de otras plantas tales como lenteja, garbanzo, almorta, judía o haba panosa, si satisfacen los siguientes requerimientos: la capacidad germinativa debería ser al menos 95%, la pureza debería ser al menos 98% y se debería cultivar en un área (terreno arable) donde no se usaran productos químicos de protección de las plantas sintéticos al menos durante los últimos tres años, así estas áreas contienen los residuos de esos productos químicos o sus productos tóxicos descompuestos en la capa de suelo de 0,001 a 200 cm en una concentración menor que el límite prescrito por la Ley.

Las semillas que tienen que germinar se cultivan en tal sistema de control de calidad (ISO 22000, HACCP, GAP) en el que las actividades se puedan seguir usando los registros y documentos relacionados con la tecnología de cultivo y las operaciones siguientes a la cosecha.

El desarrollo de la germinación:

Se seleccionan las semillas y se retiran los granos dañados de la masa, debido a que no germinan o no forman brotes sanos.

Después se remojan las semillas desinfectadas cuidadosamente durante 8 a 12 horas en agua destilada.

Las semillas absorben agua en 40 a 45% de su propia masa. Las semillas "saturadas con agua" se estratifican en

bandejas de germinación en una capa delgada, en el espesor de una semilla posiblemente, después se cubren las semillas por papel de filtro húmedo. Se ponen las bandejas en un termostato de germinación y se mantienen en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 días. Se riegan las semillas mediante agua destilada cada día para evitar que se sequen. Las semillas que germinan se implantan formando una capa gruesa en una capa de arena en la profundidad de 1-10 cm. La arena se desinfecta por lavado con ácido o por calentamiento a 400 °C en un horno de calentamiento, después se lleva a cabo la germinación en un termostato a 25 °C. El cultivo se controla cada día en el momento de suministro de agua. Es importante mencionar que las temperaturas tanto externa como interna (en la habitación) se controlan a niveles constantes. Los gérmenes producidos sin luz no contienen clorofila y su altura alcanza 20-25 cm en los 10-14 días. La cosecha tiene lugar después, en la que se retiran los tallos de las semillas y las raíces. Es necesario mantener tanto las manos como las herramientas desinfectadas durante todos los procedimientos.

B.) El tratamiento de las plántulas.

• Obtención del material.

Se obtienen 2,00-2,50 kg de plántulas (las partes por encima de las raíces), con aproximadamente 10% de contenido de material seco, de la germinación de 5 kg de semillas de guisante en el día 10º, dependiendo de la especie de la planta. Se cortan los brotes.

Las partes de la planta cortadas se congelan lentamente a -20°C para facilitar el crecimiento de cristales de hielo para destruir las paredes celulares haciendo más fácil obtener el jugo intracelular de la planta de esta manera. La temperatura de -20°C se mantiene durante dos horas, después se deja que la masa se caliente hasta 4°C. Se puede obtener aproximadamente 70 a 80 % en masa del jugo total usando una prensa de tornillo usada generalmente para producir zumos de fruta. Después de eso no se requiere filtración. El parámetro óptimo de trabajo de la prensa de tornillo es 10 a 30 N/cm³ para las plántulas.

Se presiona la cantidad total de líquido de la masa de las plántulas cortadas de alto contenido en líquido, después se recoge todo el líquido prensado en un envase. Esta disolución de aproximadamente 3,5 a 4,0 litros contiene moléculas de histaminasa, catalasa y el inhibidor de la proteasa (inhibidor de pepsina).

La forma liofilizada de este líquido es PTRNH. Esto es ya un componente de las cápsulas enterodisolvente disueltas solamente en el intestino delgado o del comprimido tomado en una forma bruta en el estómago.

Las relaciones de jugo exprimido/materiales secos son 70 a 80/20 a 30%.

Las distribuciones cuantitativas de los componentes proteínicos principales de PTRNH, la preparación de histaminasa de resistencia a la pepsina y tripsina son como sigue en las sustancias secas liofilizadas procedentes del material bruto de guisante (*Pisum sativum*), lenteja (*Lens culinaris*), garbanzo (*Cicer arietinum*), almorta (*Latirus sativus*), judía (*Phaseolus vulgaris*) y haba panosa (*Vicia fava*):

Histaminasa (diamino oxidasa)	0,1 a 2,5% en masa
Catalasa:	0,1 a 2,5% en masa
Inhibidor de proteasa (inhibidor de pepsina)	0,2 a 3,2% en masa

C.) Hay diversos métodos que se pueden usar para medir las actividades enzimáticas de las muestras:

- Medición de la concentración de histamina por fluorometría (para histaminasa, DAO),
- Medición de concentración de histamina por el método ELISA (para histaminasa, DAO),
- Medición de concentración de análogo de histamina "bencilamina" por espectrofotometría (para histaminasa, DAO)
- Medición de actividad de catalasa sobre la base de descomposición de H₂O₂ por espectrofotometría.

La prueba de la resistencia conocida de histaminasa (DAO) a tripsina se basó en la medición de la descomposición de histamina usando diferentes concentraciones de tripsina.

Las dosis de jugo prensado producido de acuerdo con el ejemplo se liofilizan de una manera conocida y los productos liofilizados se almacenan de manera segura a +4°C.

La preparación producida de la manera mencionada se señala con el signo de PTRNH.

Ejemplo 2

Todo se realiza como en el Ejemplo 1 pero se produce histaminasa pura para fines experimentales a partir del

producto liofilizado por precipitación fraccionada y filtración de gel de acuerdo con el método descrito en el artículo de McGuirl MA, McCahon CD, McKeown KA, Dooley DM: Purification and characterization of pea seedling amine oxidase for crystallization studies, Plant Physiol, 106: 1.205-1.211, 1.994.

La preparación se señala como SDAO.

5 Ejemplo 3

Todo se realiza como en el Ejemplo 1 pero se prepara una mezcla de histaminasa y catalasa a partir del jugo prensado por filtración en gel de tipo Sephadex G 100 para fines experimentales.

La preparación se señala como SDAOK.

Ejemplo 4

10 La demostración de resistencia de PTRNH frente a pepsina:

Los componentes usados:

Histaminasa de riñón de cerdo (DAO, fabricante: Sigma Aldrich Ltd., HU)

Pepsina PTRNH (fabricante: Sigma Aldrich Ltd., HU)

Tampón de fosfato de pH 3,5, de 0,1 M

15 Tampón de fosfato de pH 7,8, de 0,1 M

Reacción I: en tampón de pH 3,5, 10 minutos a 37°C (medición de actividad de la pepsina)

a) DAO de cerdo (0,1 mg/0,1 ml) + pepsina (0,1 mg/0,1 ml) + 0,2 ml de tampón (el volumen final es 0,4 ml)

b) DAO de cerdo (0,1 mg/0,1 ml) + 0,3 ml de tampón (el volumen final es 0,4 ml)

20 c) PTRNH (1 mg/0,1 ml) + pepsina (1 mg/0,1 ml) + 0,2 ml de tampón (el volumen final es 0,4 ml) (donde el contenido en histaminasa de PTRNH es 0,1 mg/0,1 ml)

d) PTRNH (1 mg/0,1 ml) + 0,3 ml de tampón (el volumen final es 0,4 ml) (donde el contenido en histaminasa de PTRNH es 0,1 mg/0,1 ml).

Nota: las proporciones de proteínas DAO/pepsina y PTRNH/pepsina fueron las mismas en ambos sistemas.

25 Reacción II: en medio final de pH 7,2, el tiempo de tratamiento es 60 minutos, a 37°C (medición de actividad de la histaminasa)

Se añadió sustrato de benzamina análogo de histamina a las muestras a; b; c y d; en la concentración final de 3 mM en 3 ml de tampón de fosfato (pH 7,8).

(El tampón con pH 7,8 cambia el medio de reacción I. de pH 3,5 sobre pH 7,2 requerido para la actividad de la histaminasa.)

30 Los resultados de los experimentos son como sigue:

Tabla 1

La prueba de la resistencia de PTRNH a pepsina comparado con una histaminasa procedente de riñón de cerdo (el efecto de pepsina durante 10 minutos a 37°C).	
Muestras	Actividad de histaminasa (%)
Histaminasa de riñón de cerdo	100
Histaminasa de riñón de cerdo + pepsina	56
PTRNH	100
PTRNH + pepsina	98,5
1. El pre-tratamiento con pepsina produjo inhibición de 44% en la DAO de riñón de cerdo.	
2. El pre-tratamiento con pepsina produjo inhibición de 1,1% en PTRNH	

Conclusión:

El jugo prensado de la plántula contiene histaminasa en una forma resistente a pepsina.

5 Esta observación añade nuevas ventajas prácticas al conocimiento primero relacionado con la histaminasa de origen vegetal.

Este resultado puede ser atribuido al hecho de que la preparación de acuerdo con la invención también contiene H_2O_2 que descompone la catalasa y un inhibidor de proteasa, además de la histaminasa resistente a tripsina de origen vegetal.

10 La novedad de las preparaciones según esta invención es el reconocimiento de que hay un componente en el jugo prensado no fraccionado de las plántulas de plantas leguminosas con actividad de la histaminasa, que puede inhibir pepsina, así es capaz de proteger la histaminasa de la pepsina en el estómago o en el tracto intestinal. Así, el efecto de descomposición de la histaminasa de la preparación permanece activo en los intestinos durante un tiempo más prolongado, eliminando el efecto negativo de la histamina.

15 Este efecto imprevisto hace posible que estas preparaciones según la invención se puedan aplicar de manera eficaz también por vía oral.

El ejemplo ya mencionado presenta algunos resultados experimentales y numéricos de PTRNH preparada a partir de guisante (*Pisum sativum* L.). Sin embargo, se obtienen resultados similares usando preparaciones preparadas a partir de lenteja (*Lens culinaris*), almorta (*Latirus sativus*), judía (*Phaseolus vulgaris*) o haba panosa (*Vicia fava*).

20 El potente efecto inhibidor de la histaminasa de preparaciones de PTRNH introducidas en un tracto intestinal humano se puede esperar que sea aproximadamente 3 x 3 mg/kg/día.

Ejemplo 5

Los efectos de diversas preparaciones con contenido de histaminasa sobre la reducción de contracciones del intestino producidas por histamina en ratas:

Las muestras:

25 I "histaminasa" (DAO) obtenida de riñón de cerdo (fabricante: Sigma -Aldrich Ltd., HU)

II Extracto de guisante que contiene "histaminasa" producida a partir de jugo prensado (SDAO) (producido según el Ejemplo 2, análogo al producto descrito en la descripción de patente europea EP 1.339.411)

III Extracto de guisante que tiene contenido en "histaminasa" y "catalasa" preparado a partir de jugo prensado y purificado (SDAOK, según el Ejemplo 3).

30 IV Preparación preparada a partir de jugo prensado no purificado con un contenido en "histaminasa + catalasa + inhibidor de la proteasa" (PTRNH según el Ejemplo 1)

El protocolo de examen:

35 Las mediciones de las contracciones de secciones de íleon de rata suspendidas se realizaron en disolución de alimentación Tyrode gaseada (GIBCO, USA) en una cámara de baño de agua de 10 ml, a 37°C ensayando los efectos de disoluciones de histamina pretratadas con diversas preparaciones de histaminasa.

El pre-tratamiento de histamina:

a.) 0,1 µg de histamina (Sigma Ltd. Budapest) en 1 ml de disolución Tyrode (Pre-incubación o 30 minutos en baño de agua a 37°C),

40 b.) 0,1 µg de histamina + DAO de cerdo (0,1 mg) en 1 ml de Disolución Tyrode (Pre-incubación durante 30 minutos en baño de agua a 37°C),

c.) 0,1 µg de histamina + SDAO (0,1 mg) en 1 ml de disolución Tyrode (Pre-incubación durante 30 minutos en baño de agua a 37°C),

d.) 0,1 µg de histamina + SDAOK (0,1 mg) en 1 ml de disolución Tyrode (Pre-incubación durante 30 minutos en baño de agua a 37°C),

45 e.) 0,1 µg de histamina + PTRNH (0,1 mg) en 1 ml de disolución Tyrode (Pre-incubación durante 30 minutos en baño de agua a 37°C).

Nota: DAO de cerdo, SDAO, SDAOK y PTRNH tienen todos el mismo contenido de histaminasa, es decir, 0,1 mg/ml de contenido en enzima pura en cada sistema.

5 Las disoluciones de histamina de volumen final de 1 ml pre-tratadas con las diferentes preparaciones de histaminasa se añaden a los contenidos de cámaras de órganos que contienen trozos de intestino suspendidos en 9 ml de disolución de alimentación Tyrode (el volumen final es 10 ml).

La sección de íleon se contrae bajo la influencia de histamina libre y la fuerza de la contracción se expresa en mili-Newton (mN) sobre la base de un programa de ordenador.

Se libera H_2O_2 de histamina descompuesta por histaminasa con un efecto irritante del intestino.

H_2O_2 es descompuesta por catalasa.

10 Los resultados son como sigue:

a.) 11 mN (bajo efecto de histamina no descompuesta, pura)

b.) 9 mN (bajo efecto de histamina parcialmente descompuesta y H_2O_2 liberada usando DAO de riñón de cerdo),

c.) 7 mN (bajo efecto de histamina parcialmente descompuesta y H_2O_2 liberada usando SDAO),

d.) 5 mN (bajo efecto de histamina parcialmente descompuesta y H_2O_2 descompuesta usando SDAOK),

15 e.) 2 mN (bajo efecto de histamina parcialmente descompuesta y H_2O_2 descompuesta usando PTRNH)

Conclusiones:

La mayor contracción se puede medir bajo el efecto de histamina no descompuesta;

El pretratamiento con histaminasa de cerdo purificada o una de guisante (DAO) (es decir, descomposición de histamina) reduce la capacidad de contracción del intestino de las preparaciones;

20 La presencia de catalasa junto con histaminasa continúa reduciendo la capacidad de contracción intestinal de la disolución (en los casos de SDAOK o PTRNH);

El pre-tratamiento con PTRNH mostró el mejor efecto protector intestinal.

Las preparaciones de PTRNH obtenidas a partir de lenteja, garbanzo, almorta, judía o haba panosa mostraron buen efecto "protector del intestino" aproximadamente similar frente a la histamina, además del obtenido de guisante.

25 Ejemplo 6

El efecto de PTRNH y la mezcla de "histaminasa + catalasa" de origen animal para la contracción del intestino producida por histamina en presencia de pepsina o sin ella.

Los materiales:

30 a.) Una preparación que contiene "histaminasa +catalasa + inhibidor de la proteasa" de origen vegetal producida a partir de jugo prensado sin purificación (PTRNH según el Ejemplo 1),

b.) histaminasa producida a partir de riñón de cerdo (DAO, fabricante: Sigma-Aldrich Ltd., HU) + catalasa preparada a partir de hígado bovino (fabricante: Sigma-Aldrich Ltd., HU)

c.) pepsina (fabricante: Sigma -Aldrich Ltd., HU)

d.) histamina (fabricante: Sigma -Aldrich Ltd., HU)

35 El sistema de examen:

La medición de las contracciones de secciones de íleon de rata suspendidas en disolución de alimentación Tyrode gaseada (GIBCO, USA) en cámara de baño de agua de 10 ml a 37°C bajo la influencia de disoluciones de histamina pretratadas de diversas maneras, como sigue:

40 a.) 0,1 µg de histamina en 1 ml de disolución Tyrode (pre-incubación durante 30 minutos en un baño de agua de 37°C),

b.) 0,1 µg de histamina + PTRNH (10 mg) en 1 ml de disolución Tyrode (pre-incubación durante 30 minutos en un baño de agua de 37°C),

c.) 0,1 µg de histamina + PTRNH (10 mg) + pepsina (10 mg) en 1 ml de disolución Tyrode (pre-incubación durante

30 minutos en un baño de agua de 37°C),

d.) 0,1 µg de histamina + histaminasa de riñón de cerdo (0,1 mg) + catalasa bovina (0,1 mg) en 1 ml de disolución Tyrode (pre-incubación durante 30 minutos en un baño de agua de 37°C),

- 5 e.) 0,1 µg de histamina + histaminasa de riñón de cerdo (0,1 mg) + catalasa bovina (0,1 mg) + pepsina (0,2 mg) en 1 ml de disolución Tyrode (pre-incubación durante 30 minutos en un baño de agua de 37°C).

Notas:

Las proporciones de proteína de histaminasa + catalasa a pepsina y PTRNH a pepsina fueron las mismas en los dos sistemas.

- 10 Las disoluciones de histamina de volumen final 1 ml y pretratadas con diferentes preparaciones se añaden a los contenidos de cámaras de órganos que contienen los trozos de intestino suspendidos en disoluciones de alimentación Tyrode de 9 ml (los volúmenes finales fueron 10 ml).

La sección de intestino del íleon se contrae bajo la influencia de histamina libre y la fuerza de esta contracción se expresa en mili-Newtons sobre la base de un programa de ordenador.

Se libera H₂O₂ de la histamina descompuesta por histaminasa, teniendo también efectos irritantes intestinales.

- 15 H₂O₂ es descompuesta por catalasa.

El inhibidor de proteasa inhibe que la pepsina descomponga la histaminasa, así queda más histamina en la disolución, con un efecto de contracción del intestino más fuerte.

Los resultados son como sigue:

- a.) 11 mN (bajo efecto de histamina no descompuesta, pura),
- 20 b.) 3 mN (bajo efecto de histamina parcialmente descompuesta y H₂O₂ completamente descompuesta), (PTRNH),
- c.) 3,5 mN (bajo efecto de histamina parcialmente descompuesta y H₂O₂ completamente descompuesta; el inhibidor de pepsina presenta un efecto mínimo sobre PTRNH),
- d.) 8 mN (bajo efecto de histamina descompuesta en pequeña extensión y H₂O₂ descompuesta) (DAO de origen animal + catalasa),
- 25 e.) 10,5 mN (la extensión de descomposición de histamina es muy pequeña debido al efecto de descomposición de la histaminasa de la pepsina y la catalasa descompone una cantidad pequeña de H₂O₂) (DAO de origen animal + catalasa + pepsina)

- 30 Las preparaciones obtenidas prensando las plántulas de lenteja, garbanzo, judía o haba panosa muestran buenos efectos "protectores intestinales" aproximadamente similares frente a la histamina también en presencia de pepsina, a los obtenidos a partir de guisante.

Ejemplo 7

Examen del efecto reductor del apetito de la mezcla de PTRNH, histaminasa y catalasa de origen animal en ratones.

Las muestras:

I Frasco de riego que contiene agua del grifo cambiada a diario.

- 35 II Frasco de riego que contiene agua del grifo cambiada a diario y 0,2 mg por 50 ml de mezcla de histaminasa (de riñón de cerdo) + catalasa (de hígado bovino) de origen animal purificada por el fabricante,

III Frasco de riego que contiene agua del grifo cambiada a diario y 10 mg por 50 ml de PTRNH (histaminasa prensada + catalasa + inhibidor de enzima de origen vegetal).

- 40 IV Frasco de riego que contiene agua del grifo cambiada a diario y 0,1 mg por 50 ml de histaminasa purificada doméstica obtenida de plántulas de guisante (SDAO).

Cada ratón bebió proteína equivalente a 5 a 10 g de histaminasa pura de promedio cada día en ambos sistemas, que es equivalente a 0,2 a 0,4 g por kg de cantidad de enzima pura en ambos sistemas.

Los animales experimentales:

I 7 ratones macho Balb/c de 8 semanas, que bebieron agua de grifo (animales de control).

II 7 ratones macho Balb/c de 8 semanas, que bebieron agua del grifo conteniendo enzima DAO purificada de origen animal.

III 7 ratones macho Balb/c de 8 semanas, que bebieron agua del grifo conteniendo PTRNH.

5 IV 7 ratones macho Balb/c de 8 semanas, que bebieron agua del grifo conteniendo histaminasa SDAO obtenida de guisante.

Se mantuvieron los animales durante 30 días en un recinto para animales.

El consumo de alimento se midió de manera precisa y se registró cada día para cada animal.

Tabla 2

Prueba del efecto reductor del apetito de PTRNH dosificado en el agua de bebida en un experimento de animales de 30 días de duración en ratones macho Balb/c de 8 semanas.	
Grupos de animales	Alimento consumido (g por ratón)
Agua de grifo que beben los ratones cambiada cada día (n=7)	156
Agua de grifo que beben los ratones conteniendo DAO purificada + catalasa de origen animal cambiada cada día (n=7)	151
20 g/ml de PTRNH que beben los ratones en agua del grifo cambiada cada día (n=7)	134
Agua del grifo que beben los ratones conteniendo SDAO extraída de guisante cambiada cada día (n=7)	153

10 Los resultados son como sigue:

1. A partir de la segunda semana del experimento, los animales a los que se suministró agua con disolución de PTRNH consumieron menos alimento que el resto de los animales.

2. No hubo diferencia entre los consumos de alimento de los animales que recibieron sólo agua, mezcla purificada de histaminasa + catalasa de origen animal o histaminasa purificada.

15 Se pueden extraer las siguientes conclusiones:

La preparación realizada por prensado conteniendo histaminasa + catalasa + inhibidor de enzima reduce la absorción de alimento cuando se introduce por vía peroral en el sistema digestivo.

Este efecto no estuvo disponible usando histaminasa purificada extraída de guisante (SDAO) o mezcla purificada de histaminasa (DAO) + catalasa de origen animal.

20 Las preparaciones PTRNH obtenidas prensando plántulas de lenteja, almorta, judía o haba panosa, además de la obtenida a partir de guisante, proporcionaron efectos reductores del apetito aproximadamente similares.

El efecto reductor del apetito de PTRNH introducido en el tracto intestinal se puede esperar a una dosis de 3 x 3 mg/kg/día para seres humanos.

Ejemplo 8

25 Examen sobre los efectos de PTRNH y la mezcla de histaminasa + catalasa de origen animal sobre la inhibición de ganancia de peso en ratones.

Las muestras:

I Frasco de riego que contiene agua del grifo cambiada a diario.

30 II Frasco de riego que contiene agua del grifo cambiada a diario y 0,2 mg por 50 ml de mezcla de histaminasa (de riñón de cerdo) + catalasa (de hígado bovino) de origen animal purificada por el fabricante.

III Frasco de riego que contiene agua del grifo cambiada a diario y 10 mg por 50 ml de PTRNH (histaminasa prensada + catalasa + inhibidor de enzima de origen vegetal).

IV Frasco de riego que contiene agua del grifo cambiada a diario y 0,1 mg por 50 ml de histaminasa purificada doméstica obtenida de plántulas de guisante (SDAO).

Cada ratón bebió proteína equivalente a 5 - 10 µg de histaminasa pura de promedio cada día en ambos sistemas, que es equivalente a 0,2 a 0,4 µg por kg de cantidad de enzima pura en ambos sistemas.

5 Los animales experimentales:

I 7 ratones macho Balb/c de 8 semanas, que bebieron agua de grifo (animales de control).

II 7 ratones macho Balb/c de 8 semanas, que bebieron agua del grifo conteniendo dos enzimas purificadas de origen animal.

III 7 ratones macho Balb/c de 8 semanas, que bebieron agua del grifo conteniendo PTRNH.

10 IV 7 ratones macho Balb/c de 8 semanas, que bebieron agua del grifo conteniendo histaminasa purificada obtenida de guisante.

Se mantuvieron los animales durante 30 días en un recinto para animales.

Se midió el peso corporal de manera precisa y se registró cada día para cada animal.

Tabla 3

Prueba del efecto reductor del peso corporal de PTRNH dosificado en el agua de bebida en un experimento de animales de 30 días de duración en ratones macho Balb/c de 8 semanas.	
Grupos de animales	Ganancia de peso corporal (g por ratón)
Agua de grifo que beben los ratones cambiada cada día (n=7)	2,2
Agua de grifo que beben los ratones conteniendo DAO purificada + catalasa de origen animal cambiada cada día (n=7)	2,3
20 µg/ml de PTRNH que beben los ratones en agua del grifo cambiada cada día (n=7)	1,9
Agua del grifo que beben los ratones conteniendo SDAO extraída de guisante cambiada cada día (n=7)	2,1

15

Los resultados son como sigue:

La ganancia de peso de los animales a los que se administró agua con disolución de PTRN fue menor durante 30 días que la de animales a los que se administró agua con agua de grifo sólo o los que recibieron mezcla de DAO purificada + catalasa de origen animal o histaminasa (SDAO) purificada obtenida a partir de plántulas de guisante.

20 Se puede observar un efecto inhibitor aproximadamente similar sobre la ganancia de peso dosificando preparaciones de PTRNH obtenidas prensando plántulas de lenteja, almorta, judía o haba panosa.

El efecto inhibitor de las preparaciones de PTRNH introducidas en el tracto intestinal sobre la ganancia de peso se puede esperar a la dosis de 3 x 3 mg/kg/día para seres humanos.

REIVINDICACIONES

1. Una preparación aplicable por vía peroral de origen vegetal, opcionalmente para el uso como agente para mejorar la digestión, reducir el apetito o reducir el peso corporal **caracterizada por que**, la preparación es un jugo prensado - que está opcionalmente en forma liofilizada – obtenido de plántulas de guisante (*Pisum-sativum* L.), lenteja (*Lens culinaris*), garbanzo (*Cicerarietinum*), almorta (*Latirussativus*), judía (*Phaseolus vulgaris*) o haba panosa (*Viciafaba*) o de una mezcla de plántulas de las plantas ya mencionadas, dicha preparación contiene histaminasa que es resistente a pepsina y tripsina, catalasa y un inhibidor de la proteasa.
- 5 2. La preparación según la reivindicación 1 **caracterizada por que**, contiene 0,1 a 2,5 % en masa de histaminasa, 0,1 a 2,5 % en masa de catalasa y 0,5 a 3,2 % en masa de inhibidor de la proteasa calculado para material seco.
- 10 3. Un procedimiento para producir la preparación según la reivindicación 1 **caracterizado por que**, la semilla de guisante (*Pisum-sativum* L.), lenteja (*Lens culinaris*), garbanzo (*Cicerarietinum*), almorta (*Latirussativus*), judía (*Phaseolus vulgaris*) o haba panosa (*Viciafaba*) o una mezcla de semillas de las plantas ya mencionadas se seleccionan, se desinfectan, se remojan en agua, se dejan germinar después, se separan las plántulas, se congelan los brotes y se mantienen a una temperatura entre -10 y -20 °C, después se dejan calentar hasta 4 a 10 °C, después
15 se prensa y se separa el jugo prensado y opcionalmente se liofiliza.