



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 319 475**

② Número de solicitud: 200501373

⑤ Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01) **A23J 3/34** (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) **C12P 21/06** (2006.01)
A61K 38/57 (2006.01) **A61P 9/12** (2006.01)
A61P 17/18 (2006.01) **A61P 31/04** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **08.06.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2009**

Fecha de la concesión: **27.01.2010**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2010**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.02.2010

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Recio Sánchez, Isidra;
Quirós del Bosque, Ana;
Hernández Ledesma, Blanca;
Gómez Ruiz, José Ángel;
Amigo Garrido, Lourdes;
López Expósito, Iván;
Ramos González, Mercedes;
Aleixandre de Artiñano, Amaya y
Miguel Castro, Marta**

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Péptidos bioactivos identificados en hidrolizados enzimáticos de caseínas lácteas y procedimiento de obtención.**

㉑ Resumen:

Péptidos bioactivos identificados en hidrolizados enzimáticos de caseínas lácteas y procedimiento de obtención. La invención consiste en la producción de productos bioactivos derivados de las proteínas lácteas para producción de lactoproductos bioactivos derivados de proteínas de lácteas en especial caseínas. Los diez péptidos objeto de la patente se pueden obtener químicamente, biotecnológicamente o por tratamiento enzimático a partir de proteínas que los contengan y dan lugar a péptidos con actividad antimicrobiana, inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina *in vitro* y/o actividad antihipertensiva y/o actividad antioxidante. Estos productos nutracéuticos, ya sea como hidrolizado o como péptido bioactivos, son tanto útiles para la industria alimentaria como para la farmacéutica.

ES 2 319 475 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Péptidos bioactivos identificados en hidrolizados enzimáticos de caseínas lácteas y procedimiento de obtención.

5 **Sector de la técnica**

La invención consiste en la producción de productos bioactivos derivados de las proteínas lácteas. Estas proteínas dan lugar, tras un tratamiento enzimático, a péptidos con actividad antimicrobiana y/o actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (actividad IECA) *in vitro* y/o actividad antihipertensiva y/o actividad antioxidante, que pueden aplicarse a la industria alimentaria y farmacéutica.

10 **Estado de la técnica**

El papel de la leche en la nutrición humana es esencial desde el momento del nacimiento y constituye un alimento con un alto valor nutritivo y funcional. El reciente desarrollo de nuevas técnicas biotecnológicas y de separación permite el fraccionamiento de distintos componentes de la leche para ser usados con nuevos propósitos alimenticios o no alimenticios y, de este modo, están apareciendo nuevas aplicaciones que contribuyen a aumentar su consumo. Así, distintas empresas dedicadas a la producción de proteínas aisladas a partir de fracciones de la leche, están interesadas en aumentar y diversificar los usos de algunos componentes, como las caseínas y las seroproteínas. Este es el caso de las industrias dedicadas a la producción de lactoferrina, utilizada como agente antimicrobiano y que ya se utiliza en alimentos infantiles, yogures, suplementos alimenticios, formulaciones especiales, productos dentales y dermatológicos. La lactoferrina también se emplea por su actividad antimicrobiana como aditivo en leche fresca para alargar su duración.

En los últimos años, los alimentos funcionales han irrumpido con fuerza en el sector alimentario, debido a la mayor concienciación de los consumidores de la relación existente entre la dieta y la salud. Dentro de los ingredientes funcionales, definidos como aquellos componentes que, incorporados al alimento, ejercen actividades biológicas específicas que van más allá del mero papel nutricional, ocupan un lugar destacado, por su diversidad y multifuncionalidad, los péptidos bioactivos. Estos péptidos corresponden a fragmentos inactivos dentro de la proteína precursora, pero que tras liberarse mediante procesos de hidrólisis *in vivo* y/o *in vitro*, ejercen distintas funciones fisiológicas en el organismo. Desde su descubrimiento, en 1979, se han descrito péptidos derivados de proteínas alimentarias con diferentes actividades biológicas: antimicrobiana, antihipertensiva, inmunomodulante, antitrombótica, opiácea, antioxidante, etc. Estos péptidos tienen un potencial uso alimentario y o farmacéutico y pueden liberarse mediante diversas estrategias, siendo la hidrólisis enzimática y la fermentación microbiana las más empleadas en la actualidad.

Entre los péptidos bioactivos, cabe destacar aquellos que ejercen propiedades antimicrobianas (R. Floris, I. Reicio, B. Berkhout, y S. Visser, Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof, Current Pharmaceutical Design, 2003, 9: 1257-1275). La actividad antimicrobiana de la leche ha sido estudiada desde hace mucho tiempo y tradicionalmente se ha atribuido a distintas proteínas con actividad antimicrobiana presentes de este alimento (inmunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidasa, lisozima, etc.). Sin embargo, recientemente, también se ha demostrado la actividad antimicrobiana de péptidos derivados de proteínas lácteas. Aunque hasta el momento no hay estudios concluyentes sobre el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos derivados de las proteínas lácteas, resultados preliminares han descrito la capacidad de algunas de estas secuencias bioactivas de interactuar y lisar las membranas bacterianas (D. Chapple, D. J. Mason, C. L. Joannou, E. W. Odell, V. Gant, R. W. Evans, Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111, Infection and Immunity, 1998, 66, 2434-2440). Se han descrito péptidos con actividad antimicrobiana obtenidos a partir de hidrolizados enzimáticos de caseínas de origen bovino, como la α_{s2} -caseína (EP 1114060, Process for producing cationic peptides from biological fluids) y la β -caseína y κ -caseína (WO99/26971, Antimicrobial peptides). Por procesos similares de hidrólisis se han aislado e identificado péptidos con propiedades antimicrobianas derivados de proteínas de suero, como la lactoferrina (WO2004/089986, Antimicrobial peptide from transferrin family).

Otro grupo de péptidos bioactivos de gran importancia es el de los péptidos con actividad antihipertensiva dada la elevada incidencia de enfermedades coronarias relacionadas con la hipertensión en países desarrollados. Muchos de estos péptidos actúan regulando el sistema renina-angiotensina mediante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (T. Takano, Milk derived peptides and hypertension reduction, International Dairy Journal, 1998, 8: 375-381) aunque no se descarta que puedan actuar mediante otros mecanismos. Se han descubierto distintos péptidos con actividad inhibidora de la ECA (IECA), obtenidos a partir de hidrolizados enzimáticos de caseínas (US 6514941, Method of preparing a casein hydrolysate enriched in anti-hypertensive peptides) y de proteínas de suero lácteo (WO01/85984, Enzymatic treatment of whey proteins for the production of antihypertensive peptides, the resulting products and treatment of hypertension in mammals). Estudios sobre la relación estructura/actividad de los péptidos con actividad antihipertensiva han puesto de manifiesto el papel fundamental de ciertos aminoácidos hidrofóbicos en el desarrollo de esta actividad (H.-S. Cheung, F.-L. Wang, M. A. Ondetti, E. F. Sabo, y D. W. Cushman, Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. Journal of Biological Chemistry 1980, 255: 401-407). La presencia de algunos de estos aminoácidos también ha sido considerada como esencial en el desarrollo de la actividad antioxidante y esta actividad ha adquirido una gran importancia en los últimos años (H. M. Chen, K. Muramoto, F. Yamauchi, K. Fujimoto y

K. Nokihara, Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46: 49-53). Diferentes enfermedades degenerativas, como el cáncer, el Alzheimer, las cataratas, o el propio envejecimiento están relacionadas con la oxidación de componentes celulares, lípidos, proteínas o ADN. Estas patologías pueden producirse como consecuencia del desequilibrio entre agentes oxidantes y los sistemas antioxidantes del organismo, por lo que la ingestión de compuestos antioxidantes en la dieta podría ser de utilidad en la prevención de este tipo de enfermedades. Además, estos compuestos antioxidantes presentes en los alimentos retardan los procesos de oxidación de las grasas, que se consideran responsables de alteraciones y de la aparición de olores y sabores desagradables en dichos alimentos. Recientes investigaciones han puesto de manifiesto la capacidad de distintas proteínas lácteas y de péptidos derivados de las mismas para ejercer una actividad antioxidante mediante diversos mecanismos de acción. Así, se han descrito péptidos con capacidad quelante de radicales libres procedentes de hidrolizados de caseínas (K. Suetsuna, H. Ukeda y H. Ochi, Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2000, 11:128-131; EP1188767, Isolated antioxidant peptides from casein and methods for preparing, isolating and identifying antioxidant peptides) y de proteínas de suero (B. Hernández-Ledesma, A. Dávalos, B. Bartolomé y L. Amigo, Preparation of antioxidant enzymatic hydrolyzates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, 588-593). Además, las caseínas se han convertido en una fuente importante de péptidos con actividad inhibitoria de las enzimas catalizadoras de los procesos de oxidación de grasas (S. G. Rival, S. Fornaroli, C. G. Boeriu y H. J. Wichers, Caseins and casein hydrolysates. I. Lipoxigenase inhibitory properties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49: 287-294).

La mayoría de los estudios llevados a cabo hasta el momento se han centrado en la actividad biológica de péptidos derivados de caseínas bovinas. Sin embargo, existen pocos datos acerca de las actividades biológicas ejercidas por péptidos procedentes de caseínas de otras especies, como la ovina o la caprina. J. A. Gómez-Ruiz, I. Recio, y A. Pihlanto (Antimicrobial activity of ovine casein hydrolysates. A preliminary study. *Milchwissenschaft-Milk Science Internacional* 2005, 60:41-45) describieron el potente efecto inhibitorio, dosis dependiente, de la actividad metabólica de *Escherichia coli* JM103 ejercida por hidrolizados de β -caseína. Sin embargo, en este estudio no se llevó a cabo la identificación de los péptidos responsables de dicho efecto. Por el contrario, se han identificado varias secuencias liberadas a partir de las caseínas ovinas durante los procesos de fermentación y maduración característicos de la elaboración del queso Manchego y algunas de ellas han demostrado actividad IECA (J. A. Gómez-Ruiz, M. Ramos e I. Recio, Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2004, 1054: 269:277). Los valores de IC₅₀ (concentración que inhibe el 50% de la actividad de la enzima) de estas secuencias estuvieron comprendidos entre 24,1 y 1275,4 μ M. En este estudio el péptido con mayor actividad inhibitoria de la IECA correspondió al fragmento α _{s2}-caseína f(205-208) de secuencia VRYL (SEQ. ID. N° 11), que presentó un valor de IC₅₀ de 24.1 μ M (J.A. Gómez-Ruiz, M. Ramos, y I. Recio, Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *Int. Dairy Journal* 2004, 1075-1080). Sin embargo, no hay datos sobre la capacidad de estos péptidos para atravesar la barrera intestinal y sobre su capacidad para ejercer el efecto antihipertensivo *in vivo*. Hay que destacar que con frecuencia, muchos péptidos que se muestran como potentes inhibidores de la IECA *in vitro* pierden toda o parte de su actividad cuando son ensayados *in vivo*, o incluso, péptidos que *in vitro* no presentan gran actividad como IECA la adquieran *in vivo* debido a la actuación de enzimas digestivas (M. Maeno, N. Yamamoto y T. Takano, Identification of an anti-hypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790, *Journal of Dairy Science*, 1996, 79: 1316-1321). Tampoco hay estudios sobre la capacidad multifuncional de los péptidos liberados de las caseínas de diferentes especies para ejercer varias actividades biológicas, como la antihipertensiva, la antimicrobiana y/o la antioxidante.

Dada la alta calidad biológica de las proteínas de la leche, es de gran interés obtener, a partir de éstas, péptidos bioactivos que consumidos como parte de la dieta, además de ejercer sus funciones nutricionales básicas, sean capaces de producir efectos metabólicos o fisiológicos, útiles en el mantenimiento de la salud y en la prevención de enfermedades. La producción de péptidos bioactivos a partir de las proteínas de la leche permitiría encontrar nuevos usos a este alimento, más allá de su valor alimenticio clásico, incluyendo la producción de productos medicinales y nutracéuticos. Esto contribuiría al desarrollo de alimentos saludables, seguros y de alta calidad, contribuyendo al aprovechamiento y revalorización de los productos lácteos.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

La presente invención consiste en la producción de productos derivados de proteínas lácteas que contienen péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana y/o actividad IECA *in vitro* y/o actividad antihipertensiva y/o actividad antioxidante, mediante hidrólisis enzimática de la fracción caseínica.

Los péptidos bioactivos se producen mediante la hidrólisis de una o más proteínas, péptidos o fragmentos de los mismos, que contienen la secuencia de aminoácidos de dichos péptidos bioactivos (preferentemente que contengan α _{s2}-caseína), empleando enzimas preferentemente pepsina) y condiciones de hidrólisis que permitan la ruptura de la cadena proteica en los lugares adecuados para su liberación. También pueden obtenerse mediante síntesis química o mediante métodos recombinantes etc. Dichos péptidos pueden consumirse como tales, o a partir de los hidrolizados

crudos, de concentrados de bajo peso molecular, o de otras subfracciones activas obtenidas mediante métodos de separación por tamaño o métodos cromatográficos.

Estos hidrolizados, sus fracciones o los péptidos, podrían formar parte de productos alimenticios, actuando como conservantes de los mismos, y reforzando tras su ingestión las defensas naturales del organismo. Además, podrían emplearse en la elaboración de productos farmacéuticos, principalmente destinados a prevenir y tratar enfermedades, como la hipertensión arterial y/o infecciones bacterianas. La invención amplía las aplicaciones de las proteínas lácteas contribuyendo a su aprovechamiento y revalorización.

10 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un método para producir péptidos bioactivos a partir de las caseínas de la leche. Dichos péptidos bioactivos son los identificados con las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 2, SEQ. ID. N° 3, SEQ. ID. N° 4, SEQ. ID. N° 5, SEQ. ID. N° 6, SEQ. ID. N° 7, SEQ. ID. N° 8, SEQ. ID. N° 9 y SEQ. ID. N° 10 (tabla 1), algunos de los cuales poseen actividad antimicrobiana y/o actividad IECA *in vitro* y/o actividad antihipertensiva y/o actividad antioxidante.

El material de partida de la presente invención sería cualquier sustrato apropiado que comprendiese una o más proteínas o péptidos, de origen animal, vegetal, o procedentes de microorganismos, que contengan la secuencia de aminoácidos de los péptidos bioactivos de interés (SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 2, SEQ. ID. N° 3, SEQ. ID. N° 4, SEQ. ID. N° 5, SEQ. ID. N° 6, SEQ. ID. N° 7, SEQ. ID. N° 8, SEQ. ID. N° 9 y SEQ. ID. N° 10, tabla 1), preferiblemente α_{s2} -caseína ovina. Dado que todos ellos pertenecen a la secuencia de la α_{s2} -caseína, resulta obvio que podría usarse cualquier preparado que contenga α_{s2} -caseína de diferentes especies, o péptidos o fragmentos de α_{s2} -caseína de cualquier tamaño, solos o mezclados con otras proteínas. Por ejemplo: α_{s2} -caseína pura, caseína entera, caseinatos y leche en sus diferentes formas de presentación, productos lácteos fermentados, hidrolizados de proteínas lácteas, subproductos lácteos, derivados lácteos para alimentación animal, etc.

Dicho material de partida se disuelve o dispersa, a una concentración apropiada, en agua o en una disolución tampón, a un pH adecuado para la actuación de la enzima proteolítica. Puede emplearse cualquier enzima proteolítica capaz de romper la proteína presente en el material de partida y proporcionar los péptidos de interés, pero preferiblemente pepsina a pH 2,0-3,0. También podrían emplearse microorganismos proteolíticos que llevasen a cabo una fermentación del sustrato y la hidrólisis de la proteína.

Las condiciones de hidrólisis: pH, temperatura, relación enzima-sustrato, interrupción de la reacción etc., se optimizan con el fin de seleccionar los hidrolizados más activos. En una realización particular, se obtienen los péptidos bioactivos empleando pepsina a pH 3,0, en una relación enzima/sustrato 3,7/100 (p/p) y realizando la hidrólisis a 37°C, durante un periodo de tiempo comprendido entre 10 minutos y 24 horas, pero, preferiblemente durante un tiempo inferior a 30 minutos.

A continuación, si se desea concentrar los péptidos bioactivos, y dado que los péptidos con actividad antimicrobiana poseen carácter catiónico se puede llevar a cabo la separación de las fracciones conteniendo los péptidos bioactivos mediante cromatografía de intercambio catiónico (FPLC). A partir de las fracciones con mayor carácter catiónico pueden aislarse subfracciones activas mediante un nuevo paso de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía hidrofóbica, etc., o preferiblemente cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC). Alternativamente, a partir del hidrolizado, pueden concentrarse los péptidos bioactivos mediante métodos tales como ultrafiltración, diálisis, electrodiálisis con membranas de poro adecuado, cromatografía de filtración por gel, etc.

Además de los hidrolizado completos y sus fracciones, los péptidos mostrados en la tabla 1 y señalados con las SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 2, SEQ. ID. N° 3, SEQ. ID. N° 4, SEQ. ID. N° 5, SEQ. ID. N° 6, SEQ. ID. N° 7, SEQ. ID. N° 8, SEQ. ID. N° 9 y SEQ. ID. N° 10, poseen propiedades bioactivas, fundamentalmente actividad antimicrobiana y/o actividad IECA y/o actividad antihipertensiva y/o actividad antioxidante y son también objeto de la presente invención. En concreto, los péptidos identificados con las secuencias SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 2, SEQ. ID. N° 3, SEQ. ID. N° 4, SEQ. ID. N° 5, SEQ. ID. N° 6, SEQ. ID. N° 7, SEQ. ID. N° 8, SEQ. ID. N° 9 y SEQ. ID. N° 10 presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y al menos la secuencia SEQ. ID. N° 3 ejerce además un potente efecto antimicrobiano frente a *Escherichia coli*. Además, los péptidos identificados con las secuencias SEQ. ID. N° 1 y SEQ. ID. N° 7 muestran una potente actividad IECA *in vitro* y las secuencia SEQ. ID. N° 7 posee actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) cuando se administra por vía oral a estos animales. Por otra parte, al menos el péptido identificado como SEQ. ID. N° 7, posee una notable actividad antioxidante mediante un mecanismo de quelación de radicales de oxígeno. Debe destacarse que se trata de péptidos naturales procedentes de productos de amplio consumo de los que cabe esperar pocos efectos secundarios y buena tolerancia.

Asimismo, los péptidos bioactivos identificados en los hidrolizados (SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 2, SEQ. ID. N° 3, SEQ. ID. N° 4, SEQ. ID. N° 5, SEQ. ID. N° 6, SEQ. ID. N° 7, SEQ. ID. N° 8, SEQ. ID. N° 9 y SEQ. ID. N° 10, tabla 1) al conocerse su secuencia, la tecnología disponible permite que pueden obtenerse por síntesis química y/o enzimática de péptidos o por métodos recombinantes.

ES 2 319 475 B1

TABLA 1

Secuencias de los péptidos bioactivos identificados

5	LKKISQ	SEQ. ID. N° 1
	VDQHQAAMKPWTQPKTNAIPY	SEQ. ID. N° 2
10	LKKISQYYQKFAWPQYL	SEQ. ID. N° 3
	LKKISQYYQKFAWPQY	SEQ. ID. N° 4
15	TVDQHQAAMKPWTQPKTNAIPYVRYL	SEQ. ID. N° 5
	LKTVDQHQAAMKPWTQPKTNAIPYVRYL	SEQ. ID. N° 6
	PYVRYL	SEQ. ID. N° 7
20	KTVDQHQAAMKPWTQPKTNAIPYVRYL	SEQ. ID. N° 8
	LKKISQYYQKFAWPQYLKT	SEQ. ID. N° 9
25	YQKFAWPQYLKTVDQHQAAMKPWTQPKTNAIPYVRYL	SEQ. ID. N° 10

No se había descrito previamente la obtención de péptidos bioactivos a partir de hidrolizados de α_2 -caseína ovina con pepsina aunque sí se habían identificado péptidos antimicrobianos derivados de esta proteína de origen bovino (EP 1114060, Process for producing cationic peptides from biological fluids). También se habían identificado previamente algunos péptidos derivados de α_2 -caseína y otras caseínas ovinas en queso Manchego con actividad IECA (J. A. Gómez-Ruiz, M. Ramos e I. Recio, Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 2004, 1054: 269:277), aunque no se había estudiado su actividad antihipertensiva *in vivo*. Entre los péptidos con actividad IECA previamente identificados se encuentra el fragmento 205-208 de la α_2 -caseína ovina de secuencia VRYL (SEQ. ID. N° 11) (IC₅₀ 24,1 μ M). Sin embargo, la secuencia SEQ. ID. N° 7 de la presente invención, PYVRYL (IC₅₀ 1.94) presenta una actividad IECA 12 veces más potente que la previamente descrita, lo que justifica la necesidad la totalidad de la secuencia que se encuentra en la presente invención para ejercer una notable actividad IECA. Además, también se requiere la totalidad de la SEQ. ID. N° 7 para ejercer la actividad antihipertensiva y/o antioxidante y/o antimicrobiana.

Estos productos derivados de la leche: los hidrolizados completos, las fracciones de los mismos, o uno o más de sus péptidos bioactivos constituyentes (incluyendo sus derivados, sus sales farmacéuticamente aceptables y sus mezclas), podrían utilizarse como sustancias terapéuticas con actividad antimicrobiana y/o actividad IECA y/o con actividad antihipertensiva y/o actividad antioxidante. Dichos productos lácteos pueden ser sometidos a un tratamiento térmico, como la pasteurización, o bien someterse a secado o liofilización etc., para emplearse como productos alimentarios funcionales, aditivos o ingredientes alimentarios, o productos farmacéuticos, para el tratamiento y/o prevención de infecciones y/o la hipertensión arterial en todas sus formas, principalmente en seres humanos, aunque también en animales. La cantidad de hidrolizado, fracción de bajo peso molecular, péptidos, sus derivados o sales farmacéuticamente aceptables y sus mezclas, así como su dosificación para el tratamiento de alguna patología, variará dependiendo de numerosos factores, como la edad, severidad de la patología o disfunción, vía de administración y frecuencia de la dosis. Estos compuestos podrían presentarse en cualquier forma de administración, sólido ó líquido, y administrarse por cualquier vía apropiada, oral, respiratoria, rectal o tópica, aunque particularmente están diseñados para una administración sólida o líquida por vía oral.

En general, el proceso de obtención de estos productos: los hidrolizados completos, las fracciones de los mismos y sus péptidos constituyentes, se podrá optimizar, dirigiéndolo a la producción de la mayor cantidad posible de péptidos bioactivos o para controlar en lo posible la aparición de amargor, originado normalmente por una elevada concentración de péptidos hidrófobos de peso molecular intermedio o bajo.

Procedimientos analíticos

Medida de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se determina de acuerdo con el método de A. Pellegrini, C. Deltting, U. Thomas, P. Hunziker (Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1526:131-140), empleando como microorganismos *Escherichia coli* [American Type Culture

ES 2 319 475 B1

Collection (ATCC), Rockville, MD, USA] ATCC 25922, *Listeria innocua* [Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) Valencia, España] CECT 910T, *Staphylococcus epidermidis* CECT 231, *Enterococcus faecalis* CECT 795, *Serratia marcescens* CECT 854 y *Staphylococcus carnosus* CECT 4491T.

5 Las suspensiones bacterianas se inoculan al 1% en el medio de cultivo Triptosa- Soja (TSB) para *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y las cepas del género *Staphylococcus*, o en el caldo infusión cerebro-corazón (BHI) para *Enterococcus faecalis* y *Listeria innocua*. La incubación se lleva a cabo a 37°C, excepto en el caso de *Serratia marcescens*, que se realiza a 30°C.

10 El inóculo bacteriano, a partir del cual se inicia el trabajo, se obtiene tras incubar una colonia crecida en TSB-Agar ó BHI-Agar en 10 mL de TSB o BHI durante toda la noche a 37°C o 30°C. La suspensión bacteriana (1 mL) se diluye 1/50 con el medio de cultivo correspondiente, incubándose a la temperatura adecuada para cada cepa hasta alcanzar una densidad de población de $1-4 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC) por mL. El cultivo se centrifuga a $2000 \times g$ durante 10 minutos, se lavan las bacterias sedimentadas dos veces con 15 mL de tampón fosfato (pH 7,4) y se ajusta la población a 10^6 UFC/mL. En una placa multipocillo estéril (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Alemania) se mezclan 50 μ L de la suspensión bacteriana, 50 μ L de la sustancia a ensayar y 100 μ L del tampón fosfato con un 2% del medio de cultivo adecuado en cada caso, y se incuba la mezcla a 37°C o 30°C durante 2 horas. Pasado este tiempo, la mezcla se diluye hasta 10^{-5} , se añaden 100 μ L de cada una de las diluciones a placas de TSB-Agar ó BHI-Agar y se incuban las placas durante 24 horas, pasadas las cuales se lleva a cabo el recuento de las colonias.

Para calcular la actividad antimicrobiana se emplea la fórmula siguiente:

$$25 \text{ Actividad antimicrobiana} = \log \frac{N_0}{N_f},$$

donde

30 N_0 corresponde al número de UFC/mL inicial

N_f corresponde al número de UFC/mL final

Medida de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)

35 La actividad IECA se mide *in vitro* de acuerdo con el método de D. W. Cushman y H. S. Cheung (Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung, *Biochemical Pharmacology*, 1971, 20:1637-1648), modificado posteriormente por Y. K. Kim, S. Yoon, D. Y. Yu., B. Lónnerdal y B. H. Chung (Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α_{s2} -casein expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Research* 1999, 66, 431-439).

45 El sustrato, hipuril histidil leucina (HHL, Sigma, Chemicals Co, St. Louis, MO, USA), se disuelve en tampón borato 0.1 M con NaCl 0.3 M, pH 8.3, para obtener una concentración final 5 mM. A 100 μ L de sustrato se le añaden 40 μ L de cada una de las muestras cuya actividad IECA se quiere determinar. Se adiciona la enzima ECA (EC 3.4.15.1, Sigma), disuelta en glicerol al 50%, y diluida en el momento de realizar el ensayo 1/10 en agua bidestilada. La reacción se lleva a cabo a 37°C, durante 30 minutos en un baño de agua. La enzima se inactiva descendiendo el pH con 150 μ L de HCl 1N. El ácido hipúrico formado se extrae con 1000 μ L de acetato de etilo. Tras agitación en vórtex durante 20 segundos, se centrifuga a $3000 \times g$ durante 10 minutos y a temperatura ambiente. Se toman 750 μ L de la fase orgánica que se evapora por calentamiento a 95°C durante 10 minutos. El residuo de ácido hipúrico se redisuelve en 800 μ L de agua bidestilada y, tras agitar durante 20 segundos, se mide la absorbancia a 228 nm en un espectrofotómetro Dur-70 de Beckman Instruments, Inc., Fullerton, EEUU.

Para calcular el porcentaje de actividad IECA se emplea la fórmula siguiente:

$$55 \text{ \% IECA} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}} * 100$$

60 El blanco se utiliza para corregir la absorbancia de fondo. Este contiene sustrato, enzima y 20 μ L de agua bidestilada en lugar de muestra, y la reacción se para a tiempo cero. El control supone el cien por cien de la acción enzimática sobre el sustrato en ausencia de inhibidores, y contiene 20 μ L de agua en lugar de muestra y se incuba el mismo tiempo que la muestra.

65 Los resultados se presentan como IC_{50} (μ M) o concentración a la que se inhibe el 50% de la actividad de la enzima. La concentración de proteína se determina mediante el ensayo del ácido bicinónico (Pierce, Rockford, IL, EEUU) empleando como patrón seroalbúmina bovina.

ES 2 319 475 B1

Medida de la actividad antioxidante

La capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) se determina siguiendo el método desarrollado por B. X. Ou, M. Hampsch-Woodill, RL. Prior (Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, 2001, 49:4619-4626). Este método se basa en la oxidación de la fluoresceína por los radicales peróxidos producidos *in situ* por descomposición térmica del 2,2'-azobis 2-amidinopropano dihidrocloruro (AAPH). La oxidación de la fluoresceína causa un descenso de la fluorescencia a $\lambda_{exc} = 493$ nm y $\lambda_{em} = 515$ nm. La presencia de antioxidantes evita o retrasa la descomposición de la fluoresceína.

La solución de trabajo de la fluoresceína se prepara diariamente a una concentración 60 nM a partir de una solución madre de fluoresceína 100 μ M en tampón fosfato 75 mM (pH 7,5). Como antioxidante de referencia se utiliza ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), que se prepara a una concentración 20 mM (solución madre) en tampón fosfato y se conserva a -20°C. Se obtiene una curva de calibrado de Trolox por el análisis de las soluciones patrón de concentraciones 12,5; 25; 40; 50 y 100 μ M, preparadas a partir de la solución madre. El AAPH se disuelve en el tampón fosfato hasta una concentración final de 143 mM, manteniéndose a baja temperatura para impedir su degradación.

Para llevar a cabo el ensayo, se mezclan 375 μ L de la muestra con 375 μ L del AAPH y 2,225 mL de fluoresceína, incubando esta mezcla a 37°C. Cada 5 minutos se mide la fluorescencia ($\lambda_{exc} = 493$ nm y $\lambda_{em} = 515$ nm) en el fluorímetro RF-1501 (Shimadzu). Se realizan controles del ensayo consistentes en un blanco que contiene fluoresceína y tampón fosfato, para comprobar la estabilidad de la fluoresceína durante el experimento, y un control positivo de oxidación máxima que contiene fluoresceína, AAPH y tampón fosfato. Como control de la medida de actividad antioxidante, se incluye una solución de trolox 40 μ M en cada set de muestras a analizar. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

La actividad antioxidante se cuantifica a través de la medida del “área bajo la curva” (AUC) de la curva de decadencia de la fluorescencia de fluoresceína y se expresa como equivalentes de Trolox (valor de ORAC). El AUC se calcula empleando la siguiente fórmula:

$$AUC = (0,5 + f_5/f_0 + f_{10}/f_0 + f_{15}/f_0 + \dots + f_{30}/f_0)$$

Donde f_0 es la fluorescencia a tiempo cero y f_i es la fluorescencia a tiempo i .

El valor relativo ORAC para los péptidos se determina con la siguiente fórmula:

$$ORAC = [(AUC_{muestra} - AUC_{blanco}) / (AUC_{trolox} - AUC_{blanco})] \times [(molaridad\ del\ trolox / molaridad\ de\ la\ muestra)]$$

Aislamiento de fracciones peptídicas mediante cromatografía de intercambio iónico (FPLC)

El aislamiento de fracciones peptídicas se lleva a cabo siguiendo el método de I. Recio, S. Visser (Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α_{s2} -casein. Biochimica et Biophysica Acta 1999, 1428:314-326) con algunas modificaciones, en un equipo de FPLC, usando una columna de intercambio catiónico HiLoad™ 26/10 SP Sepharose Fast Flow (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Las fases A y B están constituidas por NH_4HCO_3 10 mM (ajustada a pH 7,0 con HCOOH) y NH_3 1,5 M, respectivamente. Las muestras se disuelven en la fase A preparadas a una concentración de 5 mg/mL, inyectándose un volumen de 5 mL mediante un Superloop™ (Pharmacia) de 50 mL. El hidrolizado eluye a un flujo de 5 mL/min. Tras 20 minutos con 100% de solvente A, se aplica un gradiente del 0 al 50% del solvente B en A en 60 minutos, seguido de 20 minutos con el 50% del solvente B. La detección se lleva a cabo a una absorbancia de 214 nm. La temperatura de la columna y de las fases móviles es de 9°C. Las fracciones se recogen tras varios análisis cromatográficos.

Aislamiento de fracciones peptídicas mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC) a escala semi-preparativa

Se utiliza un equipo formado por dos bombas programables modelo Waters Delta 600, un detector de diodos alineados modelo 966, un inyector automático modelo 717 plus, y un colector de fracciones automático (Waters Corp., Milford, MA, EEUU). Se usa una columna C_{18} Prep NovaPack® HR, 7.8 x 300 mm y 6 μ m de tamaño de poro (Waters), con un cartucho C_{18} (Waters) como guardacolumna. Los análisis se realizan a 30°C y la detección a 214 y 280 nm. La adquisición de los datos se lleva a cabo con el Software Millennium versión 3.2 (Waters). Las muestras se preparan a una concentración de 2,5 mg/mL y, previamente a la inyección, se centrifugan a 16 000 \times g durante 10 minutos. Para la elución de las muestras se utiliza un gradiente binario de agua milliQ® (fase A) y acetonitrilo (fase B) con 0,1% y 0,08% de ácido trifluoroacético, respectivamente, y un flujo de 4 mL/min. El gradiente de fase B es del 0% al 40% en 50 minutos y del 40% al 70% durante 5 min, lavándose la columna con 70% de B durante 5 minutos y

ES 2 319 475 B1

acondicionando de nuevo la columna en las condiciones iniciales durante 25 min. El volumen de muestra inyectado es de 300 μl .

5 *Análisis mediante espectrometría de masas en tandem (off-line)*

Se emplea un equipo de trampa iónica Esquire 3000 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Las muestras se preparan a una concentración de 2 mg/mL en una solución de agua:acetonitrilo al 50% (v/v) con ácido fórmico al 0,01% (v/v). La muestra se inyecta en el nebulizador de electrospray a un flujo de 4 $\mu\text{l}/\text{min}$, utilizando una bomba de jeringa tipo 22 (Harvard Apparatus, South Natick, MA, EEUU). El equipo emplea nitrógeno como gas nebulizador y de secado, y opera con una presión de helio de 5×10^{-3} bar. Los espectros de masas se adquieren en un intervalo de 100-2000 m/z , y a una velocidad de 13000 Da/segundo. La interpretación de los espectros de masas en tandem para la identificación de las secuencias peptídicas se realiza con el programa Biotools 2.1 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania).

15

Análisis mediante RP-HPLC acoplado on-line a espectrometría de masas en tandem (RP-HPLC-MS/MS)

Se emplea un equipo Esquire-LC (Bruker Daltonik GMBH, Bremen, Alemania). El equipo de HPLC (serie 1100) está formado por una bomba cuaternaria, un inyector automático, un sistema de desgasificación de eluyentes y un detector ultravioleta de longitud de onda variable (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) acoplado en línea a un espectrómetro de masas de trampa iónica Esquire 3000 (Bruker Daltonik). La columna es una columna Hi-Pore C18 (250 x 4,6 mm d.i., 5 μm de tamaño de partícula) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EEUU). El disolvente A es una mezcla de agua y ácido trifluoroacético (1000:0.37) y el disolvente B una mezcla de acetonitrilo y ácido trifluoroacético (1000:0.27). Se inyectan 50 μl de muestra preparada a una concentración de 4,5 mg/ml. Se emplea un flujo de 0.8 ml/min, con un gradiente lineal del 0% al 50% de disolvente B en A en 60 minutos. El eluyente se monitoriza a 214 nm, mediante espectrofotometría de masas, bajo las mismas condiciones que las indicadas en el apartado anterior, salvo que el flujo de inyección de la muestra a través del nebulizador es de 275 $\mu\text{l}/\text{min}$.

30

Estudio de la actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)

Se estudia el efecto de varios de los péptidos identificados sobre la presión arterial de ratas SHR. Los péptidos se sintetizan químicamente para este estudio.

35

El estudio se realiza con ratas macho SHR, de 17-20 semanas de edad, y peso comprendido entre 300 y 350 g, procedentes de Charles River Laboratories España S.A. Las ratas se almacenan en jaulas de cinco en cinco, y se mantienen a una temperatura estable de 25°C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, ingiriendo agua y comida a libre disposición. Se llevan a cabo medidas de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), y para ello se utiliza el método del manguito en la cola ("tail cuff") (RD. Buñag, Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure, J. Appl. Physiol., 1973, 34: 279-282). El equipo que se utiliza (Le5001, Leticia) proporciona valores digitales de la PAS y de la PAD automáticamente. Este equipo registra y facilita también la medida de la frecuencia cardíaca de los animales. Antes de colocar el manguito y el transductor en la cola de las ratas, éstas se exponen a una temperatura próxima a los 37°C para facilitar la dilatación de la arteria caudal. Además, para asegurar la fiabilidad de la medida, los animales se acostumbran al procedimiento 2 semanas antes de llevar a cabo el ensayo en cuestión. El valor de la PAS y de la PAD se establece realizando 3 medidas consecutivas, y calculando la media de los tres valores correspondientes a cada una de estas dos variables.

50

Las ratas SHR utilizadas para el estudio tenían valores de PAS comprendidos entre 190 mm Hg y 220 mm Hg, y valores de PAD comprendidos entre 130 mm Hg y 180 mm Hg.

La administración de los productos a ensayar se realiza mediante sonda intragástrica en un margen de tiempo comprendido entre las 9 y las 10 h de la mañana, y la dosis ensayada se administra disuelta en 1 ml de agua destilada. Se toman medidas de la PAS y de la PAD antes de la administración, y se toman también medidas periódicas de estas variables cada 2 horas después de la administración, hasta 8 horas post-administración. Adicionalmente, se toman también medidas de la PAS y de la PAD 24 horas después de la administración de dichos productos. Como control negativo (para establecer la variación circadiana de la PAS y de la PAD en ratas sondadas) se utilizan las medidas de la PAS y de la PAD obtenidas en ensayos semejantes con ratas a las que se administra mediante sonda intragástrica 1 ml de agua. Como control positivo, se utilizan las medidas de la PAS y de la PAD obtenidas en ensayos semejantes con ratas a las que se administra mediante sonda intragástrica 50 mg/kg de captopril (fármaco IÉCA prototipo). Esta dosis de captopril se administra a cada rata disuelta en 1 ml de agua destilada.

65

Los resultados se agrupan y se obtiene la media \pm el error estándar de la media (ESM) para un mínimo de 6 ensayos homogéneos. Para compararlos se utiliza un análisis de varianza de una vía, seguido del test de Bonferroni. Se considera significativa la diferencia para valores de $p < 0.05$.

Breve descripción del contenido de las figuras

La figura 1 representa un cromatograma, obtenido utilizando cromatografía de intercambio catiónico (FPLC), del hidrolizado de la α_{s2} -caseína ovina con pepsina durante 30 minutos, en el que se seleccionan 5 fracciones (FA-FE), que fueron recogidas manualmente. En el eje de abscisas se representa el tiempo en minutos.

La figura 2A es un cromatograma, obtenido utilizando cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC) a escala semipreparativa, de la fracción FC recogida a partir del hidrolizado de α_{s2} -caseína ovina con pepsina durante 30 minutos. Se seleccionan 4 subfracciones (FC1-FC4), que fueron recogidas automáticamente. En el eje de abscisas se representa el tiempo en minutos.

La figura 2B es un cromatograma, obtenido utilizando cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC) a escala semipreparativa, de la fracción FD recogida a partir del hidrolizado de α_{s2} -caseína ovina con pepsina durante 30 minutos. Se seleccionan 2 subfracciones (FD1-FD2), que fueron recogidas automáticamente. En el eje de abscisas se representa el tiempo en minutos.

La figura 3 representa la actividad antimicrobiana de las distintas subfracciones obtenidas a partir de las fracciones FC y FD mediante RP-HPLC a escala semipreparativa.

La figura 4 representa la disminución de la presión arterial sistólica (PAS), y la disminución de la presión arterial diastólica (PAD), obtenidas en ratas espontáneamente hipertensas, tras la administración mediante sonda intragástrica de 1 ml de agua (○), 50 mg/kg de Captopril (□), 3 mg/kg de PYVRYL (▲), y 3 mg/kg de LKKISQ (◆). T(h) representa el tiempo transcurrido desde la administración expresado en horas. Los datos representan la media \pm ESM para un mínimo de 6 animales. ^aP<0.05 vs agua; ^bP<0.05 vs Captopril; ^cP<0.05 vs PYVRYL.

Ejemplos de realización de la invención

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, aunque no deben considerarse como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Obtención de péptidos bioactivos, con actividad antimicrobiana, IECA, antihipertensiva y antioxidante, a partir del hidrolizado de α_{s2} caseína ovina con pepsina

El hidrolizado se obtuvo empleando como sustrato α_{s2} -caseína ovina, obtenida tras la separación del resto de las caseínas mediante el método de H. J. Vreeman, J. A. M. van Riel (The large-scale isolation of α_{s2} -casein from bovine casein. Netherlands Milk and Dairy Journal, 1990, 44:43-48). Como enzima se utilizó pepsina porcina (E.C. 3.4.23.1. 570 U/mg de proteína), procedente de estómago de cerdo (Sigma Chemical, St. Louis, USA). Se preparó una disolución acuosa de la α_{s2} -caseína ovina al 0,5% y el pH se ajustó a 3,0 con HCl 1 M. Se añadió pepsina (relación enzima/sustrato 3,7/100, p/p). La hidrólisis se llevó a cabo a 37°C durante 30 minutos. La inactivación de la pepsina se consiguió por calentamiento a 80°C durante 15 minutos y posterior ajuste del pH a 7,0 con NaOH 1 M. El sobrenadante recogido tras la centrifugación del hidrolizado a 16000 g durante 15 minutos a 5°C se analizó mediante FPLC (Figura 1), se separaron cinco fracciones (FA-FE), que se recogieron manualmente y posteriormente se liofilizaron.

Se midió la actividad antimicrobiana de estas cinco fracciones a una concentración de 2,5 mg/mL, empleando como control *E. coli* a $5,9 \times 10^5$ UFC/mL. Los resultados revelaron que las fracciones FC y FD presentaban actividad antimicrobiana, reduciendo el número de microorganismos en 2,54 y 0,6 órdenes de magnitud, respectivamente.

Con objeto de identificar los péptidos responsables de la actividad antimicrobiana las fracciones FC y FD se analizaron mediante RP-HPLC a escala semipreparativa. En la Figura 2 se muestra el perfil cromatográfico de la fracción FC (Figura 2A) y la fracción FD (Figura 2B). A partir de la fracción FC se separaron cuatro subfracciones (FC1-FC4) y a partir de la fracción FD dos subfracciones (FD1-FD2). Cada una de estas subfracciones se recogieron y, tras la evaporación del acetonitrilo, se liofilizaron. Se midió la actividad antimicrobiana de estas subfracciones a una concentración de 2,5 mg/mL contra *E. coli* ($6,2 \times 10^6$ UFC/mL). En la Figura 3 se muestran los valores de actividad antimicrobiana frente a *E. coli* de estas subfracciones. De todas las subfracciones, cabe destacar la FC1, que fue la que exhibía mayor actividad antimicrobiana, ya que tuvo efecto bactericida a la concentración ensayada ($\log N_t/N_0$ mayor de 6). Las subfracciones FC4, FD1 y FD2 mostraron una moderada actividad antimicrobiana, con valores de reducción del número de microorganismos de 1,24, 1,31 y 1,64 órdenes de magnitud, respectivamente.

Las subfracciones FC1, FC4, FD1 y FD2 se analizaron por espectrometría de masas, utilizando un analizador de trampa iónica siguiendo la metodología previamente descrita. Los péptidos identificados se muestran en la Tabla 1.

ES 2 319 475 B1

TABLA 1

Péptidos identificados en las subfracciones FC1, FC4, FD 1 y FD2 obtenidas a partir del hidrolizado de α_{s2} -caseína ovina con pepsina durante 30 minutos

5

Subfr. Nº.	Masa exp.	Masa teórica	Proteína	Posición	Aminoácidos	Secuencia Nº.	
10	FC1	715.4	715.4	α_{s2} -caseína	165-170	LKKISQ	SEQ. ID. Nº. 1
	FC4	3011.8	3011.5	α_{s2} -caseína	184-208	VDQHQQAMKPWTQPKTNAIPYVRYL	SEQ. ID. Nº. 2
	FC4	2203.2	2203.1	α_{s2} -caseína	165-181	LKKISQYYQKFAWPQYL	SEQ. ID. Nº. 3
	FC4	2089.8	2090.1	α_{s2} -caseína	165-180	LKKISQYYQKFAWPQY	SEQ. ID. Nº. 4
15	FC4	3111.3	3112.6	α_{s2} -caseína	183-208	TVDQHQQAMKPWTQPKTNAIPYVRYL	SEQ. ID. Nº. 5.
	FD1	3354.3	3353.8	α_{s2} -caseína	181-208	LKTVDQHQQAMKPWTQPKTNAIPYVRYL	SEQ. ID. Nº. 6
	FD1	809.4	809.4	α_{s2} -caseína	203-208	PYVRYL	SEQ. ID. Nº. 7
20	FD1	3240.3	3240.7	α_{s2} -caseína	182-208	KTVDQHQQAMKPWTQPKTNAIPYVRYL	SEQ. ID. Nº. 8
	FD1	2433.0	2432.3	α_{s2} -caseína	165-183	LKKISQYYQKFAWPQYLKT	SEQ. ID. Nº. 9
	FD2	4566.8	4565.3	α_{s2} -caseína	172-208	YQKFAWPQYLKTVDQHQQAMKPWTQPKTNAIPYVRYL	SEQ. ID. Nº. 10

25

Ejemplo 2

30

Péptidos obtenidos mediante síntesis química con actividad antimicrobiana

Se sintetizaron químicamente los péptidos mayoritarios presentes en las subfracciones obtenidas del hidrolizado de α_{s2} -caseína ovina con pepsina durante 30 minutos (SEQ. ID. Nº. 1; SEQ. ID. Nº. 2; SEQ. ID. Nº. 3 y SEQ. ID. Nº. 7). Estos péptidos se sintetizaron mediante el método Fmoc en fase sólida y su pureza se verificó mediante RP-HPLC-MS/MS.

35

Se midió la actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos a una concentración de 0,5 mM, frente a *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria innocua*. Los resultados de actividad se muestran en la tabla 2.

40

TABLA 2

Actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos identificados en las subfracciones FC1, FC4 y FD1 obtenidas a partir del hidrolizado de α_{s2} -caseína ovina con pepsina durante 30 minutos

45

Sec. Nº	Aminoácidos	<i>E. coli</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>L. innocua</i>	
50	SEQ. ID. Nº. 1	LKKISQ	0.33	0	> 6	3.6	0	1,11
	SEQ. ID. Nº. 2	VDQHQQAMKPWTQPKTNAIPYVRYL	0.07	0	> 6	0.61	0	1.71
55	SEQ. ID. Nº. 3	LKKISQYYQKFAWPQYL	4.63	0.38	> 6	> 6	3.32	> 6
60	SEQ. ID. Nº. 7	PYVRYL	0.27	0	2.23	2.06	0	1.13

65

La actividad antimicrobiana de estos péptidos contra bacterias Gram positivas es elevada, sobre todo frente a las especies ensayadas del género *Staphylococcus*. Tres de estos péptidos SEQ. ID. Nº. 1; SEQ. ID. Nº. 2 y SEQ. ID. Nº. 3 presentaron actividad bactericida frente a *S. carnosus*. Sin embargo, las bacterias Gram negativas (*E. coli* y *S. marcescens*) son muy resistentes a la acción de todos estos péptidos, aunque cabe destacar que el péptido identificado como SEQ. ID. Nº. 3 mostró una elevada actividad antimicrobiana frente a *E. coli*.

ES 2 319 475 B1

Ejemplo 3

Péptidos obtenidos mediante síntesis química con actividad IECA y antihipertensiva

5 Se midió la actividad IECA de dos de los péptidos sintetizados químicamente, concretamente las secuencias SEQ. ID. N° 1 y SEQ. ID. N° 7, mencionados en el ejemplo 1. Los resultados de actividad, expresada como IC₅₀, o concentración proteica necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima se muestran en la Tabla 3.

10 Los dos péptidos presentan una potente actividad IECA.

TABLA 3

15 *Actividad IECA de los péptidos sintéticos identificados en las subfracciones FC 1 y FD 1 obtenidas a partir del hidrolizado de α_{s2} -caseína ovina con pepsina durante 30 minutos*

Secuencia N°	Aminoácidos	IC ₅₀ (μM)
SEQ. ID. N° 1	LKKISQ	2.10
SEQ. ID. N° 7	PYVRYL	1.94

25 Se ensayó la actividad antihipertensiva de los péptidos SEQ. ID. N° 1 y SEQ. ID. N° 7, para lo cual se administraron dichos péptidos (3 mg/kg) a ratas SHR. Los péptidos se disolvieron en agua destilada y la dosis correspondiente se administró a cada rata en un volumen de 1 mL.

30 La Figura 4 muestra las disminuciones de la PAS y de la PAD obtenidas en ratas SHR, en distintos momentos, tras la administración de 3 mg/kg de los péptidos SEQ. ID. N° 1 y SEQ. ID. N° 7. Se puede observar que la administración del péptido SEQ ID N° 7 ocasiona una disminución significativa de la PAS y de la PAD en estos animales. La disminución de estas variables es máxima 4 horas después de la administración de este péptido. La disminución presenta, además, un curso temporal semejante al de la disminución de PAS y de PAD producida por la administración de captopril, que es un compuesto de probada actividad antihipertensiva. Estos resultados demuestran que el péptido
35 identificado por la secuencia SEQ. ID. N° 7 tiene un claro y pronunciado efecto antihipertensivo cuando se administra de forma aguda por vía oral.

40 Ejemplo 4

Péptidos obtenidos mediante síntesis química con actividad antioxidante

45 Se midió la actividad antioxidante de la secuencia SEQ. ID. N° 7, mencionada en el ejemplo 1. El valor de actividad quelante de radicales peroxilo se muestra a continuación:

$$\text{ORAC}_{\text{PYVRYL}} = 1.82 \mu\text{mol Trolox equivalentes}/\mu\text{mol péptido}$$

50 Los resultados muestran, por tanto, que el péptido PYVRYL (SEQ. ID. N° 7) presenta una actividad antioxidante 1.82 veces superior a la actividad de 1 μmol de Trolox.

REIVINDICACIONES

1. Péptido bioactivo **caracterizado** por

- 5 a. poseer actividad antimicrobiana y/o actividad IECA *in vitro* y/o actividad antihipertensiva *in vivo* y/o actividad antioxidante
- b. presentes en hidrolizados enzimáticos de caseínas lácteas con pepsina y
- 10 c. las secuencias de aminoácidos del grupo siguiente: SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 2, SEQ. ID. N° 3, SEQ. ID. N° 4, SEQ. ID. N° 5, SEQ. ID. N° 6, SEQ. ID. N° 7, SEQ. ID. N° 8, SEQ. ID. N° 9 y SEQ. ID. N° 10.

15 2. Péptido bioactivo según la reivindicación 1 de secuencias SEQ. ID. N° 2, SEQ. ID. N° 5, SEQ. ID. N° 6, SEQ. ID. N° 7, SEQ. ID. N° 8, o SEQ. ID. N° 10 **caracterizados** por comprender la SEQ. ID. N° 7.

3. Péptido bioactivo según la reivindicación 1 de secuencias SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 3, SEQ. ID. N° 4, o SEQ. ID. N° 9 **caracterizados** por comprender la SEQ. ID. N° 1.

20 4. Péptido bioactivo según las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado** por presentar actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas.

25 5. Péptido bioactivo según las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado** por la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. N° 3 y presentar actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*.

6. Péptido bioactivo según las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado** por la secuencia de aminoácidos SEQ. ID. N° 1 ó SEQ. ID. N° 7 y presentar actividad IECA *in vitro*.

30 7. Péptido bioactivo según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** por la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 7 y por presentar actividad antihipertensiva.

8. Péptido bioactivo según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** por la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 7 y por presentar actividad antioxidante mediante quelación de radicales de oxígeno.

35 9. Péptido bioactivo según las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** por obtenerse mediante un procedimiento de síntesis química o enzimática o mediante métodos recombinantes.

40 10. Péptido bioactivo según las reivindicaciones 9, **caracterizado** por obtenerse por un procedimiento de hidrólisis enzimática de α_{s2} -caseína o caseína entera o leche en sus diferentes formas de presentación, subproductos lácteos, o productos lácteos fermentados.

11. Procedimiento para producir cualquiera de los péptidos bioactivos según la reivindicación 1 a 8, **caracterizado** por:

- 45 a. obtenerse por hidrólisis del material de partida que seria cualquier sustrato apropiado que contenga una o más proteínas o péptidos, de origen animal o vegetal, o procedentes de microorganismos, preferiblemente α_{s2} -caseína o caseína o leche entera, cuya secuencia de aminoácidos comprendiese la secuencia de aminoácidos de alguno de los péptidos bioactivos de interés indicados en la reivindicación 1,
- 50 b. disolverse o dispersarse dicho material de partida, a una concentración apropiada, en agua o en una disolución tampón, a un pH adecuado para la actuación de la enzima proteolítica,
- 55 c. emplearse cualquier enzima proteolítica capaz de romper la proteína presente en el material de partida y proporcionar los péptidos de interés, pero preferiblemente pepsina a pH 3,0; o microorganismos proteolíticos que llevaran a cabo una fermentación del sustrato, y
- d. el tiempo de reacción estaría comprendido entre 10 minutos y 24 horas, pero que preferiblemente fuera de 30 minutos.

60 12. Péptido bioactivo según las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado** porque para su obtención se emplean los procedimientos indicados en la reivindicación 11.

65 13. Producto bioactivo **caracterizado** porque contiene al menos alguno de los péptidos indicados en las reivindicaciones 1 a 3 al tratarse del propio hidrolizado enzimático, cualquiera de sus fracciones, o una purificación de los mismos.

ES 2 319 475 B1

14. Péptido bioactivo **caracterizados** por ser derivados o sales farmacéuticamente aceptables, o las mezclas de cualquiera de los productos bioactivos indicados en las reivindicaciones 1 a 10 y 12 y 13.

5 15. Composición farmacéutica **caracterizada** por comprender al menos alguno de los productos bioactivos con actividad antimicrobiana y/o actividad IECA *in vitro* y/o actividad antihipertensiva *in vivo* y/o actividad antioxidante según las reivindicaciones 1 a 10 y 12, 13 y 14.

10 16. Aditivo, ingrediente, o suplemento alimentario funcional **caracterizado** por comprender al menos alguno de los productos bioactivos con actividad antimicrobiana, IECA *in vitro* y/o actividad antihipertensiva *in vivo* y/o actividad antioxidante según las reivindicaciones 1 a 10 y 12, 13 y 14.

15 17. Producto alimentario funcional **caracterizado** por comprender al menos alguno de los productos bioactivos con actividad antimicrobiana, IECA *in vitro* y/o actividad antihipertensiva *in vivo* y/o actividad antioxidante según las reivindicaciones 1 a 10 y 12, 13 14 y 16.

18. Composición farmacéutica según la reivindicación 15 para su uso en la elaboración de un medicamento destinado a la prevención y/o el tratamiento de infecciones microbianas.

20 19. Composición farmacéutica según la reivindicación 15 para su uso en la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento de la hipertensión.

20. Uso de aditivo, ingrediente, alimentario funcional según la reivindicación 16 en la elaboración de un producto alimentario funcional favorable para prevenir infecciones microbianas.

25 21. Uso de aditivo, ingrediente, alimentario funcional según la reivindicación 16 en la elaboración de un producto alimentario funcional favorable para mitigar la hipertensión.

30

35

40

45

50

55

60

65

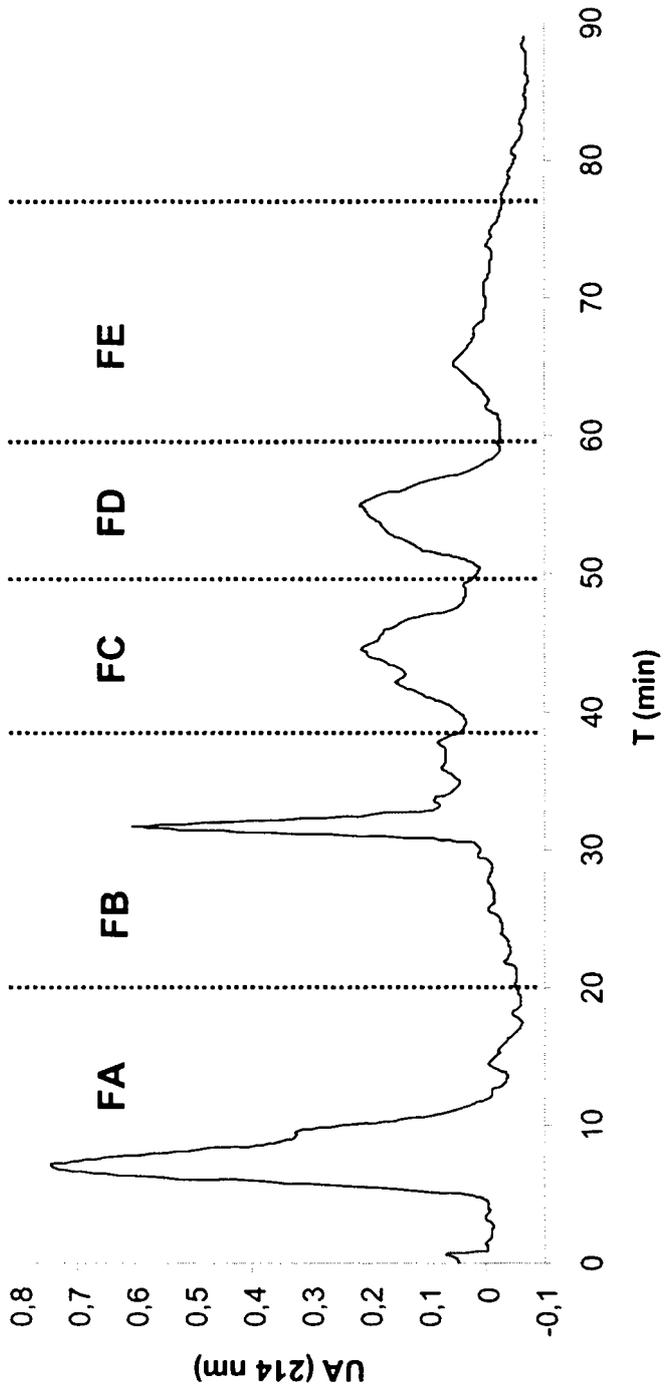


Figura 1

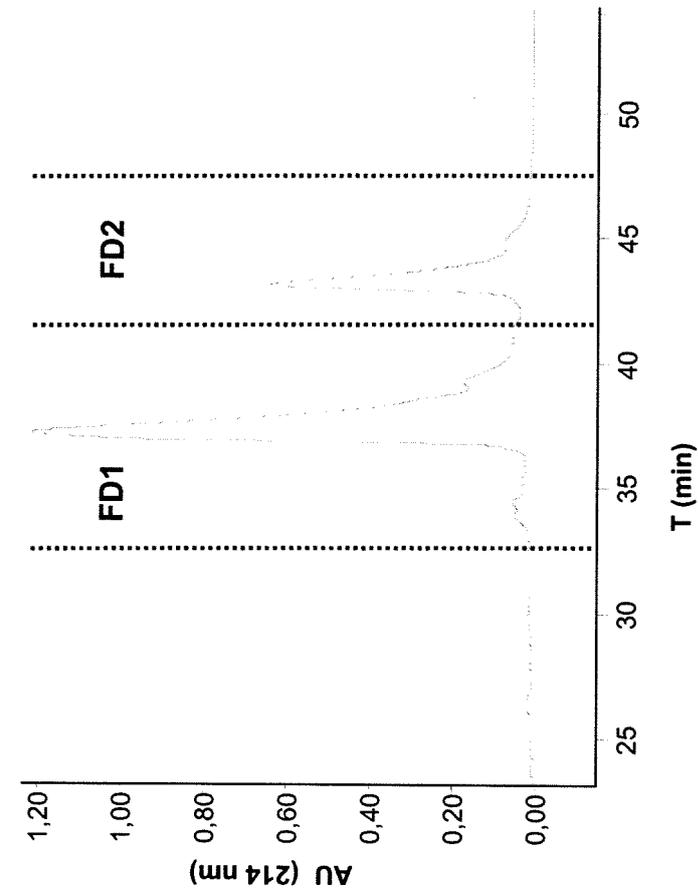


Figura 2B

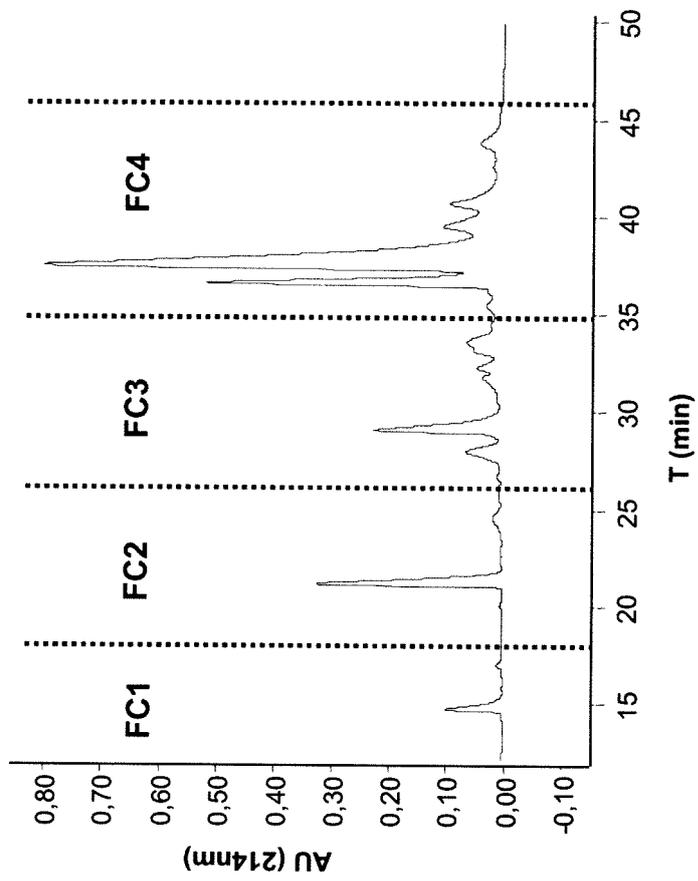


Figura 2A

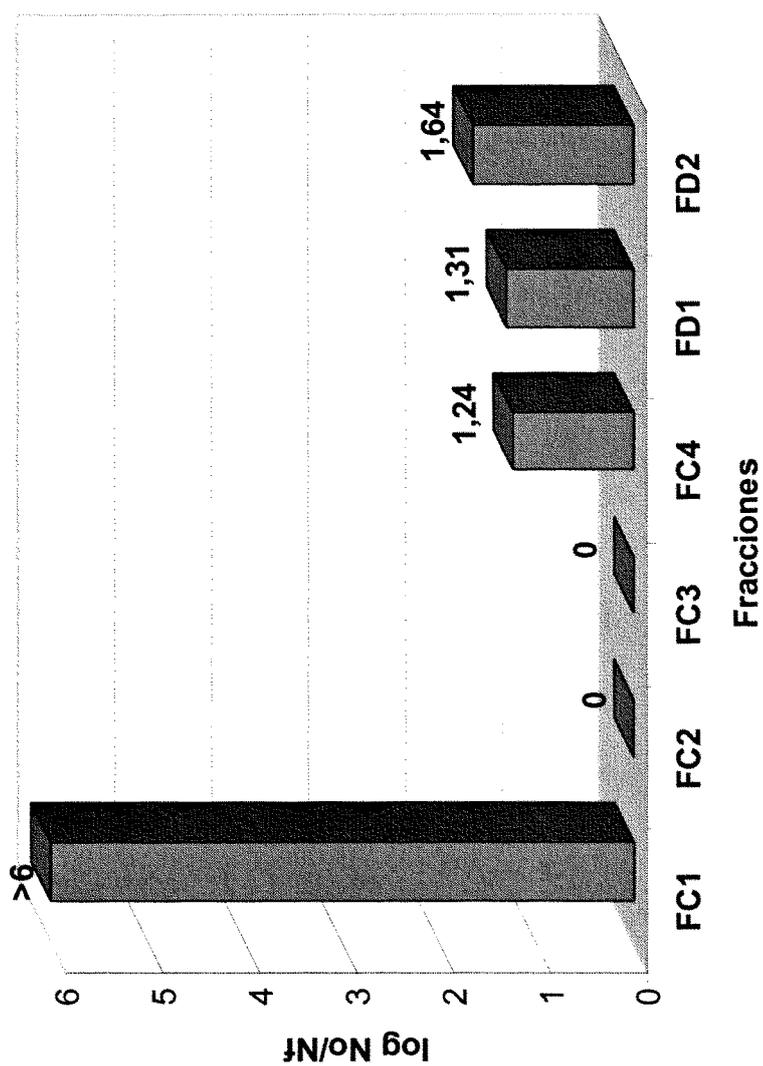


Figura 3

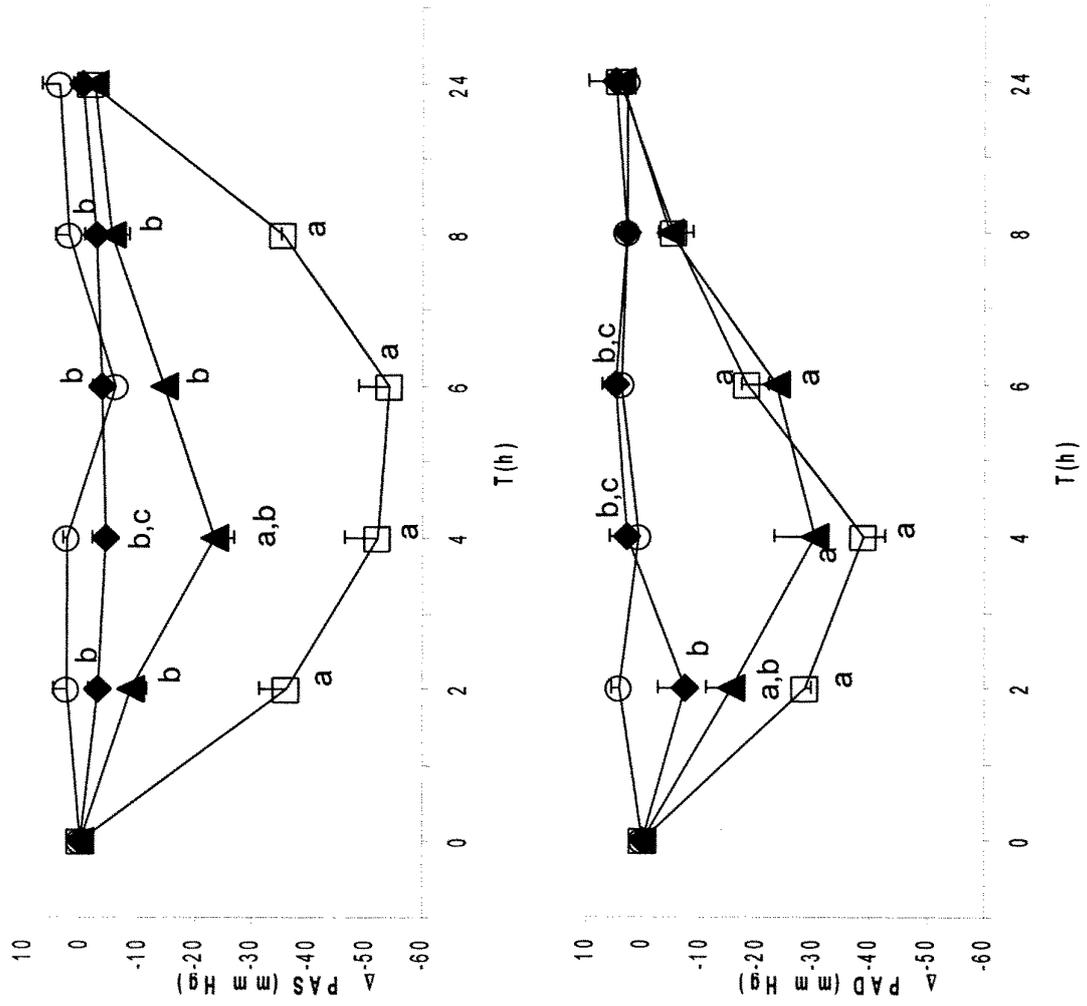


Figura 4

ES 2 319 475 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
Amigo Garrido, Lourdes
5 Ramos González, Mercedes
Recio Sánchez, Isidra
Miguel Castro, Marta
López Expósito, Iván
10 Gómez Ruiz, José Angel
Hernández Ledesma, Blanca
Quirós del Bosque, Ana
Aleixandre de Artiñano, Amaya
- <120> PÉPTIDOS BIOACTIVOS IDENTIFICADOS EN HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE CASEÍNAS LÁCTEAS Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN.
- <130> PEPCAS
- 20 <160> 11
- <170> PatentIn version 3.1
- 25 <210> 1
<211> 6
<212> PRT
- 30 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Derivado de Caseína
- 35 <220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(6)
<223>
- 40 <400> 1
- 45 Leu Lys Lys Ile Ser Gln
1 5
- <210> 2
- 50 <211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 55 <220>
<223> Derivado de Caseína
<220>
- 60 <221> PEPTIDO
<222> (1)..(25)
<223> Incluida SEQ ID N°1

65

ES 2 319 475 B1

<400> 2

5 Val Asp Gln His Gln Lys Ala Met Lys Pro Trp Thr Gln Pro Lys Thr
1 5 10 15
Asn Ala Ile Pro Tyr Val Arg Tyr Leu
20 25
10

<210> 3

<211> 17

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Derivado de Caseína

<220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)..(17)

25 <223> Incluida SEQ ID N°1

<400> 3

30 Leu Lys Lys Ile Ser Gln Tyr Tyr Gln Lys Phe Ala Trp Pro Gln Tyr
1 5 10 15
35 Leu

<210> 4

40 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Derivado de Caseína

<220>

<221> PEPTIDO

50 <222> (1)..(16)

<223> Incluida SEQ ID N°1

<400> 4

55 Leu Lys Lys Ile Ser Gln Tyr Tyr Gln Lys Phe Ala Trp Pro Gln Tyr
1 5 10 15
60

<210> 5

<211> 26

<212> PRT

65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 319 475 B1

<220>
<223> Derivado de Caseína
<220>
5 <221> PEPTIDO
<222> (1)..(26)
<223> Incluida SEQ ID N°7
10 <400> 5

Thr Val Asp Gln His Gln Lys Ala Met Lys Pro Trp Thr Gln Pro Lys
1 5 10 15

Thr Asn Ala Ile Pro Tyr Val Arg Tyr Leu
20 25
20 <210> 6
<211> 28
<212> PRT
25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Derivado de Caseína
30 <220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(28)
<223> Incluida SEQ ID N°7
35 <400> 6

Leu Lys Thr Val Asp Gln His Gln Lys Ala Met Lys Pro Trp Thr Gln
1 5 10 15

Pro Lys Thr Asn Ala Ile Pro Tyr Val Arg Tyr Leu
20 25
45 <210> 7
<211> 6
50 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Derivado de Caseína
<220>
<221> PEPTIDO
60 <222> (1)..(6)
<223> IN
65

ES 2 319 475 B1

<400> 7

5 Pro Tyr Val Arg Tyr Leu
1 5

<210> 8

<211> 27

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Derivado de Caseína

<220>

<221> PEPTIDO

20 <222> (1)..(27)

<223> Incluida SEQ ID N°7

<400> 8

25 Lys Thr Val Asp Gln His Gln Lys Ala Met Lys Pro Trp Thr Gln Pro
1 5 10 15

30 Lys Thr Asn Ala Ile Pro Tyr Val Arg Tyr Leu
20 25

35 <210> 9

<211> 19

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Derivado de Caseína

<220>

45 <221> PEPTIDO

<222> (1)..(19)

<223>

50

<400> 9

55 Leu Lys Lys Ile Ser Gln Tyr Tyr Gln Lys Phe Ala Trp Pro Gln Tyr
1 5 10 15

Leu Lys Thr

60 <210> 10

<211> 37

<212> PRT

65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 319 475 B1

<220>

<223> Derivado de Caseína

<220>

5 <221> PEPTIDO

<222> (1)..(37)

<223> Incluida SEQ ID N°7

10 <400> 10

Tyr Gln Lys Phe Ala Trp Pro Gln Tyr Leu Lys Thr Val Asp Gln His
1 5 10 15

15 Gln Lys Ala Met Lys Pro Trp Thr Gln Pro Lys Thr Asn Ala Ile Pro
20 25 30

20 Tyr Val Arg Tyr Leu
35

25 <210> 11

<211> 4

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Derivado de Caseína ovina

35 <220>

<221> PEPTIDO

<222> (1)..(4)

<223>

40 <400> 11

45 Val Arg Tyr Leu
1

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 319 475

② Nº de solicitud: 200501373

③ Fecha de presentación de la solicitud: **08.06.2005**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HERNANDEZ-LEDESMA, B. et al. "Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion". JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. 2004, Vol. 52, nº6, páginas 1504-1510. Materiales y Métodos y Tabla 1.	1-21
A	KOHMURA, M. et al. "Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human beta-casein". AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY. 1989. Vol. 53, nº 8, páginas 2107-2114. Tabla 1.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

23.04.2009

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 14/47 (2006.01)

A23J 3/34 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

A61K 38/57 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

A61P 17/18 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)