



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 303 090**

51 Int. Cl.:

C07K 14/77 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

A23J 3/08 (2006.01)

A61K 38/38 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04766983 .3**

86 Fecha de presentación : **23.07.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1661913**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

54 Título: **Péptidos bioactivos derivados de proteínas de la clara de huevo mediante hidrólisis enzimática.**

30 Prioridad: **31.07.2003 ES 200301829**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2008

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

72 Inventor/es: **Miguel Castro, Marta;
López-Alonso Fandiño, R.;
Recio Sánchez, María I.;
Ramos Gonzales, María M. y
Aleixandre de Artiñano, A.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Péptidos bioactivos derivados de proteínas de la clara de huevo mediante hidrólisis enzimática.

5 Sector de la técnica

La presente invención consiste en la producción de ovoproductos bioactivos derivados de proteínas de clara de huevo. Tras un tratamiento enzimático, éstas dan lugar a péptidos con actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (actividad inhibidora de ECA) *in vitro* y/o actividad antihipertensiva y/o actividad antioxidante, que pueden aplicarse en la industria alimentaria y farmacéutica.

Estado de la técnica

El papel del huevo en la nutrición humana es esencial ya que constituye una fuente de alimentación nutritiva y saludable. El reciente desarrollo de nuevas técnicas biotecnológicas y de separación permite el fraccionamiento de distintos componentes del huevo 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 que se dedican a la producción de proteínas aisladas a partir de fracciones del huevo, están interesadas en aumentar y diversificar el uso de algunos componentes, tales como la ovoalbúmina y la ovotransferrina. Este es el caso de las industrias dedicadas a la producción de lisozima, utilizada como agente antimicrobiano, que obtienen otras fracciones nitrogenadas de bajo coste como subproductos, destinadas generalmente a alimentación animal o para su uso como emulsionantes y gelificantes en diferentes alimentos.

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, es decir, componentes que, incorporados al alimento, proporcionan al mismo actividades biológicas específicas que van más allá de la simple nutrición, ocupan un lugar destacado los péptidos bioactivos, por su diversidad y multifuncionalidad. Los péptidos bioactivos corresponden a fragmentos que se encuentran inactivos dentro de la proteína precursora, pero que se pueden liberar mediante hidrólisis *in vivo* o *in vitro* y, de esta forma, ejercer diferentes funciones fisiológicas en el organismo. Desde su descubrimiento en 1979, se han descrito péptidos derivados de proteínas de alimentos con diferentes actividades biológicas: antihipertensiva, antitrombótica, opiácea, antioxidante, inmunomodulante, etc.

Entre los péptidos bioactivos, cabe destacar aquellos que ejercen actividad antihipertensiva mediante la regulación del sistema renina-angiotensina (T. Takano, Milk derived peptides and hypertension reduction, International Dairy Journal, 1998, 8: 375-381). Es bien conocida la elevada incidencia de las enfermedades coronarias en la población, y el tratamiento de la hipertensión constituye una de las estrategias más utilizadas para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. El mecanismo de acción de estos péptidos se ha explicado mediante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que cataliza la formación de angiotensina II, un octapéptido con una potente actividad vasoconstrictora y que, además, desactiva la bradiquinina, la cual produce vasodilatación. Se han descubierto distintos péptidos con actividad inhibidora de ECA (IECA), obtenidos a partir de hidrolizados enzimáticos 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), caseínas (US6514941, Method of preparing a casein hydrolysate enriched in anti-hypertensive peptides), etc. [0005] Otro grupo de péptidos bioactivos de gran importancia es el de los péptidos con actividad antioxidante. El envejecimiento y diversas patologías (alteraciones neurológicas, cánceres, cataratas, etc.) están relacionados con la oxidación de componentes celulares, tales como lípidos, proteínas o ADN, de manera que la inclusión de antioxidantes en la dieta tiene un carácter preventivo. Además de su actividad antioxidante, estos compuestos pueden prevenir la oxidación de las grasas, evitando de este modo la aparición de olores desagradables en los alimentos. Algunas investigaciones han demostrado la capacidad de distintas proteínas y de hidrolizados de las mismas para ejercer una acción antioxidante, actuando como secuestradores de radicales libres (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) o bien, inhibiendo enzimas relacionadas con la oxidación de las 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). Debe destacarse que los estudios de la relación estructura-actividad de los péptidos IECA y antioxidantes han puesto de manifiesto una característica común a ambos: la importancia de ciertos aminoácidos hidrofóbicos en estas dos actividades biológicas (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).

Entre las estrategias más utilizadas para obtener péptidos activos para su uso alimentario, cabe destacar la hidrólisis enzimática y los procesos fermentativos. Además, en los últimos años se han propuesto distintos tratamientos tecnológicos para la funcionalización de proteínas. El uso de altas presiones hidrostáticas como método físico de desnaturalización, tiene como resultado la modificación de los enlaces no covalentes responsables de la estructura de las proteínas, dando lugar a cambios conformacionales que conducen a un estado desplegado. Varios estudios han demostrado que la proteólisis se acelera y aparecen diferentes productos de hidrólisis en condiciones de alta presión, en comparación con lo que ocurre a presión atmosférica (F. Bonomi, A. Fiocchi, H. Frokiaer, A. Gaiaschi, S. Iametti, C. Poesi, P. Rasmussen, P. Restani y P. Royere, Reduction of immunoreactivity of bovine β -lactoglobulin upon combined

physical and proteolytic treatment, Journal of Dairy Research, 2003, 70: 51-59). Debe tenerse en cuenta también que la mayoría de las enzimas mantienen su actividad hasta 400 MPa, volviéndose inactivas a presiones mayores. Sin embargo, en la bibliografía no se ha descrito la producción de péptidos bioactivos en condiciones de alta presión.

5 A diferencia de otras proteínas de alimentos, existen muy pocos estudios relacionados con péptidos bioactivos derivados de las proteínas de huevo, aún cuando el huevo es una fuente de nitrógeno muy importante en la dieta. H. Fujita, K Yokoyama, y M. Yoshikawa (Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins, Journal of Food Science, 2000, 65: 564-569) encontraron actividades IECA en hidrolizados de ovoalbúmina con pepsina y termolisina, con valores de IC_{50} (concentración que inhibe el 50% de la actividad de la enzima) de 45,0 y 83,0 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Estos autores aislaron seis péptidos con actividad IECA partiendo del hidrolizado con pepsina, con valores de IC_{50} desde 0,4 a 15 μM , aunque ninguno de ellos, excepto el dipéptido LW, mostró actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Se postuló que dichos péptidos serían sustratos de la ECA, pero no verdaderos inhibidores, y por tanto mostrarían actividades IECA aparentes en el ensayo *in vitro* (H. Fujita y M. Yoshikawa, LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein, Immunopharmacology, 1999, 44:123-127). Estas observaciones demuestran que, aunque es un buen punto de partida para el trabajo, la actividad IECA *in vitro* no puede ser el único criterio de selección, ya que no tiene en consideración las transformaciones fisiológicas en el organismo que determinan la biodisponibilidad de los péptidos (digestión y paso a través de la barrera gastrointestinal para llegar a la sangre en una forma activa).

20 Se han descrito dos péptidos con actividad vasodilatadora que provienen de la misma región de la ovoalbúmina hidrolizada con diferentes enzimas. H. Fujita, H. Usui, K. Kurahashi y M. Yoshikawa (Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin B1 agonist peptide derived from ovalbumin, Peptides, 1995, 16: 785-790 y JP 5 331 190) encontraron que la ovokinina, un octapéptido aislado de ovoalbúmina hidrolizada con pepsina (FRADHPFL), mostraba actividad vasorelajadora en arterias mesentéricas caninas, pero no poseía actividad IECA. La ovokinina poseía actividad antihipertensiva cuando se administraba oralmente a ratas espontáneamente hipertensas (SHR) en dosis de 100 mg/kg (H. Fujita, R. Sasaki y M. Yoshikawa, Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidyl-choline, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1995, 59: 2344-2345). N. Matoba, H. Usui, H. Fujita y M. Yoshikawa (A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery, FEBS Letters, 1999, 452:181-184), partiendo de un hidrolizado de ovoalbúmina con quimotripsina, purificaron un hexapéptido correspondiente a un fragmento 2-7 de la ovokinina (RADHPF, ovokinina (2-7)) que ejercía una potente acción vasodilatadora en SHR en dosis de 10 mg/kg.

Posteriormente, se sintetizaron análogos de la ovokinina (2-7) con el objetivo de aumentar su actividad antihipertensiva. Entre éstos, RPFHPF y RPLKPW mostraron, respectivamente, 10 y 100 veces más actividad que la ovokinina (2-7) tras la administración a SHRs (dosis mínimas efectivas de 1 y 0,1 mg/kg), lo que se atribuyó a una mayor resistencia del tracto digestivo a las proteasas (N. Matoba, Y. Yamada, H. Usui, R. Nakagiri y M. Yoshikawa, Designing potent derivatives of ovokinin (2-7), an anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2001, 65: 736-739 y Y. Yamada, N. Matoba, H. Usui y K. Onishi, Design of a highly potent antihypertensive peptide based on ovokinin (2-7), Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2002, 66: 1213-1217). Debe destacarse que, de acuerdo con estos autores y a diferencia de la mayoría de los péptidos antihipertensivos de origen alimentario, ni la ovokinina (2-7), ni sus derivados RPFHPF o RPLKPW poseían actividad IECA. Se ha postulado que disminuirían la presión arterial a través de su interacción con receptores del tracto gastrointestinal o debido a efectos en el sistema nervioso central.

45 Dada la alta calidad biológica de las proteínas del huevo, es de gran interés obtener péptidos bioactivos partiendo de éstas, los cuales consumidos como parte de la dieta, además de ejercer sus funciones nutricionales básicas, serían capaces de producir efectos metabólicos o fisiológicos útiles en el mantenimiento de la salud. La producción de péptidos bioactivos a partir de las proteínas de la clara de huevo permitiría encontrar nuevos usos para los huevos de gallina, más allá de su valor alimenticio clásico, incluyendo la producción de bioproductos medicinales y nutracéuticos. Esto ayudaría en el desarrollo de alimentos saludables, seguros y de alta calidad, a la utilización y revalorización de los ovoproductos.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

La presente invención consiste en la producción de ovoproductos que contienen péptidos bioactivos con actividad IECA *in vitro* y/o actividad antihipertensiva y/o actividad antioxidante, mediante hidrólisis enzimática de ovoalbúmina.

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 ovoalbúmina, utilizando enzimas (preferiblemente pepsina) y condiciones de hidrólisis que permiten la ruptura de cada cadena proteica en los lugares adecuados para su liberación. También se pueden obtener mediante síntesis química o enzimática o mediante procedimientos recombinantes. Dichos péptidos pueden consumirse como tales, o sobre la base de hidrolizados crudos, de concentrados de bajo peso molecular o de otras subfracciones activas obtenidas mediante métodos de separación por tamaño o métodos cromatográficos.

Además de formar productos alimenticios, dichos hidrolizados, sus fracciones o los péptidos también podrían formar parte de productos farmacéuticos. Por tanto, podrían ayudar en el tratamiento y prevención de enfermedades, particularmente en el control de la presión arterial. La presente invención amplía las aplicaciones de las proteínas del huevo, contribuyendo a su aprovechamiento y revalorización.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método para producir péptidos activos a partir de ovoalbúmina. Estos péptidos bioactivos se identifican con las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEC. ID. No. 1, SEC. ID. No. 4, SEC. ID. No. 6, SEC. ID. No. 7 y SEC. ID. No. 8 (tabla 1), que poseen actividad IECA *in vitro* y/o actividad antihipertensiva *in vivo* y/o actividad antioxidante.

El material de partida para la presente invención sería cualquier sustrato apropiado que comprende una o más proteínas o péptidos de origen animal o procedentes de microorganismos, cuya secuencia de aminoácidos incluye la secuencia de aminoácidos de los péptidos bioactivos de interés (SEC. ID. No. 1, SEC. ID. No. 4, SEC. ID. No. 6, SEC. ID. No. 7 y SEC. ID. No. 8, tabla 1). Dado que todas pertenecen a la secuencia de la ovoalbúmina, resulta obvio que podría usarse cualquier preparado que contenga ovoalbúmina o péptidos o fragmentos de ovoalbúmina de cualquier tamaño, solos o mezclados con otras proteínas. Por ejemplo: ovoalbúmina pura, clara de huevo y huevo entero en sus diferentes formas de presentación, ovoproductos destinados a hostelería y restauración, complementos dietéticos para deportistas u ovoproductos para alimentación animal.

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

Las condiciones de hidrólisis: pH, temperatura, presión, proporción enzima-sustrato, interrupción de la reacción etc., se optimizan con el objetivo de seleccionar los hidrolizados más activos. En una realización particular, se obtienen péptidos bioactivos utilizando pepsina a pH 2,0, en una proporción enzima/sustrato 1/100 p/p, y realizando la hidrólisis a 37°C a presión atmosférica (0,1 MPa), durante un periodo de tiempo entre 10 minutos y 24 horas, aunque preferiblemente durante un tiempo inferior a 3 horas. El uso de altas presiones hidrostáticas, hasta 400 MPa, acelera la hidrólisis del sustrato sin inhibir la enzima proteolítica y modifica el perfil de los péptidos obtenidos.

A continuación, si se desea concentrar los péptidos bioactivos y dado que los péptidos con actividad IECA contienen aproximadamente de 3 a 6-7 aminoácidos (A. Pihlanto-Leppälä, T. Rokka y H. Korhonen, Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins, International Dairy Journal, 1998, 8:325-331), se pueden obtener, a partir de los hidrolizados, fracciones de bajo peso molecular mediante métodos tales como ultrafiltración, diálisis, electrodiálisis con membranas del tamaño de poro adecuado, cromatografía de filtración en gel, etc. En una realización particular, se obtienen las fracciones de los hidrolizados de peso molecular inferior a 3000 Da mediante ultrafiltración a través de una membrana hidrofílica de 3000 Da. Dichas fracciones muestran mayor actividad IECA y actividad antihipertensiva que los hidrolizados de partida. A partir de las fracciones de bajo peso molecular de los hidrolizados pueden aislarse subfracciones activas mediante cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de intercambio iónico o, preferiblemente cromatografía de alta eficacia en fase inversa.

Además de los hidrolizados completos y sus fracciones, los péptidos mostrados en la tabla 1 y designados con las SEC. ID. No. 1, SEC. ID. No. 2, SEC. ID. No. 3, SEC. ID. No. 4, SEC. ID. No. 5, SEC. ID. No. 6, SEC. ID. No. 7 y SEC. ID. No. 8, poseen propiedades bioactivas, fundamentalmente actividad IECA y/o antihipertensiva y/o antioxidante y también se describen en la presente invención. Específicamente, los péptidos identificados con las secuencias SEC. ID. No. 2, SEC. ID. No. 3, SEC. ID. No. 5 y SEC. ID. No. 6 muestran una potente actividad IECA *in vitro* y las secuencias SEC. ID. No. 2, SEC. ID. No. 3 y SEC. ID. No. 6 poseen actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), pero no en ratas normotensas Wistar-Kyoto (WKY) cuando se administran por vía oral. Además, por lo menos el péptido identificado como SEC. ID. No. 6, posee actividad antioxidante frente a radicales libres. Debe destacarse que éstos son péptidos naturales en los que se esperan pocos efectos secundarios y buena tolerancia.

Asimismo, los péptidos bioactivos identificados en los hidrolizados (SEC. ID. No. 1, SEC. ID. No. 2, SEC. ID. No. 3, SEC. ID. No. 4, SEC. ID. No. 5, SEC. ID. No. 6, SEC. ID. No. 7 y SEC. ID. No. 8) se pueden obtener mediante síntesis química y/o enzimática de péptidos o mediante procedimientos recombinantes.

TABLA 1

Secuencias de péptidos bioactivos identificados

5	YQIGL	SEC ID No. 1
	IVF ⁺	SEC ID No. 2
10	RADHPFL ⁺	SEC ID No. 3
	FSL	SEC ID No. 4
	FRADHPFL ⁺⁺	SEC ID No. 5
15	YAEERYPIL	SEC ID No. 6
	RDILNQ	SEC ID No. 7
	SALAM	SEC ID No. 8

* Secuencia mostrada sólo con objetivos ilustrativos

* Secuencia previamente identificada como ovokinina (H. Fujita; H. Usui; K. Kurahashi y M. Yoshikawa, Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin B1 agonist peptide derived from ovoalbumin, *Peptides*, 1995, 16: 785-790). Debe destacarse que estos autores comprobaron su actividad vasodilatadora en arterias mesentéricas caninas, pero afirman que no posee actividad IECA.

La obtención de péptidos bioactivos a partir de hidrolizados de clara de huevo con pepsina no se había descrito previamente, aunque ya se había demostrado la actividad IECA *in vitro* de hidrolizados de ovoalbúmina (H. Fujita, K. Yokoyama, y M. Yoshikawa, Classification and antihypertensive activity of antiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins, *Journal of Food Science*, 2000, 65: 564-569). La clara de huevo resulta ser un sustrato proteico barato y fácilmente accesible para producir péptidos bioactivos. Además, tampoco se había demostrado la actividad antihipertensiva *in vivo* de los hidrolizados de ovoalbúmina. Tal como ya se ha explicado, debe destacarse que con frecuencia, muchos péptidos que se muestran como potentes inhibidores de la ECA *in vitro* pierden toda o parte de su actividad cuando son ensayados *in vivo*, o incluso, péptidos que *in vitro* no muestran gran actividad como inhibidores de la ECA, adquieren dicha actividad *in vivo* debido a la acción 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).

Estos ovoproductos: los hidrolizados completos, las fracciones de los mismos de bajo peso molecular, o uno o más de sus péptidos bioactivos constituyentes (incluyendo sus derivados, sus sales farmacéuticas aceptables y sus mezclas), podrían utilizarse como sustancias terapéuticas con actividad IECA y/o con actividad antihipertensiva y/o con actividad antioxidante. Dichos ovoproductos pueden someterse a un tratamiento térmico, tal como la pasteurización, o someterse a secado, liofilización etc., para utilizarse como productos alimentarios funcionales, aditivos o ingredientes alimentarios, o productos farmacéuticos, para el tratamiento y/o prevención de 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, junto con su dosificación para el tratamiento de cualquier patología concreta variará dependiendo de numerosos factores, tales como la edad, gravedad de la patología o disfunción, vía de administración y frecuencia de la dosis. Estos compuestos pueden presentarse en cualquier forma de administración, sólido ó líquido, y se puede administrar mediante 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 ovoproductos: los hidrolizados completos, las fracciones de los mismos de bajo peso molecular y sus péptidos constituyentes, se podrá optimizar con el propósito de una producción de la mayor cantidad posible de péptidos bioactivos o para controlar en lo posible la aparición de amargura, causada normalmente por una elevada concentración de péptidos hidrofóbicos de peso molecular intermedio o bajo.

ES 2 303 090 T3

Procedimientos analíticos

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

La actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se mide *in vitro* según 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. Lönnnerdal y B. H. Cheung (Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α s1-casein expressed in *Escherichia coli*, *Journal of Dairy Research* 1999, 66, 431-439).

El sustrato hipuril histidil leucina (HHL, Sigma, Chemicals Co, St. Louis, MO, Estados Unidos) se disuelve en tampón borato 0,1 M con NaCl 0,3 M, pH 8,3, para obtener una concentración final de 5 mM. A 100 μ l de sustrato se 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 1/10 en agua bidestilada en el momento de realizar el ensayo. La reacción se lleva a cabo a 37°C durante 30 minutos en un baño de agua. La enzima se desactiva 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 4000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se toman 750 μ l de la fase orgánica y se evaporan mediante calentamiento a 95°C durante 10 minutos. El residuo de ácido hipúrico se redissuelve 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, Estados Unidos.

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

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

El blanco se utiliza para corregir la absorbancia de fondo. Éste contiene sustrato, enzima y 20 μ l de agua bidestilada en lugar de la muestra, y la reacción se para a tiempo cero. El control implica 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 la muestra y se incuba el mismo tiempo que la muestra.

Los resultados se presentan como IC₅₀ (μ M o μ g/ml) 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 bicinonínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) utilizando seroalbúmina bovina como referencia.

Medida de la actividad antioxidante

Para medir la actividad antioxidante, se utiliza el método desarrollado por R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang y C. Rice-Evans (Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biological Medicine*, 1999, 26: 1231-1237). El método se basa en la desaparición del radical ABTS⁺ (ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) debido a la acción reductora de diferentes muestras con actividad antioxidante. El radical ABTS⁺ muestra un máximo de absorbancia a 734 nm. La actividad antioxidante se detecta por la disminución en el tiempo de la absorbancia a 734 nm.

Para generar el radical ABTS⁺, el compuesto ABTS (Sigma), disuelto en agua a una concentración de 7 mM, se pone en contacto con persulfato potásico 2,45 mM en una proporción 1:2 durante 24 horas en ausencia de luz. Después de 24 horas, la absorbancia a 734 nm se ajusta a un valor de 0,70 $\pm$ 0,02 con tampón fosfato salino (PBS) 5 mM, 138 mM de NaCl, pH = 7,4. En un experimento estándar, se añade 1 ml de esta solución a 10 μ l de la muestra (1,5 mM), disuelta en tampón fosfato sódico 0,02 M, pH= 6,5. El experimento se realiza por triplicado, incubando cada muestra con el radical ABTS⁺ durante 10 minutos a 37°C, con lecturas de la absorbancia a 734 nm en los minutos 1, 6 y 10. Como blanco se utiliza tampón fosfato sódico 0,02 M, pH= 6,5 y al mismo tiempo que se lleva a cabo la incubación de las muestras, se incuba el radical ABTS⁺ sin ningún agente antioxidante (control). La actividad antioxidante de cada muestra se calcula con respecto a la absorbancia a 734 nm mostrada por el control. La actividad antioxidante de la muestra se expresa en relación a la actividad antioxidante del Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Sigma), análogo de la vitamina E, mediante un valor TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox) en un tiempo determinado.

Se han desarrollado diferentes maneras de calcular el valor TEAC. Utilizamos el método descrito por F.W.P.C. van Overveld, G.R.M.M. Haenen, J. Rhemrev, J.P.W. Vermeiden y A. Bast (Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma, *Chemical and Biological Interactions*, 2000, 127: 151-161), que es válido para calcular el valor TEAC de un compuesto puro, el cual provoca una disminución de la absorbancia que aumenta linealmente a medida que aumenta la concentración. En este caso, sólo sería necesario calcular una concentración determinada de un compuesto para poder calcular su valor TEAC.

$$TEAC \text{ compuesto} = \frac{\text{Variación de la Abs}_{734nm}}{0,28045 \times [\text{Concentración de compuesto}]}$$

El valor 0,28045 representa la disminución de la absorbancia provocada por 1 mM de Trolox.

ES 2 303 090 T3

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

Se utiliza un equipo que consiste en 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., Mildford, MA, Estados Unidos). Se usa una columna C18 Prep NovaPack[®] HR, 7,8 x 300 mm y 6 μ m de tamaño de poro (Waters), con un cartucho C₁₈ (Waters) como guardacolumna. El análisis se realiza a 30°C y la detección a 214 y 280 nm. La agrupación de los datos se lleva a cabo con el Software Millennium versión 3.2 (Waters). Para la elución de las muestras se utiliza un gradiente binario de agua (fase A) y acetonitrilo (fase B) con 0,1% de TFA en cada una de ellas y un flujo de 4 ml/min. El gradiente de fase B es del 2% al 10% en 15 minutos, del 10% al 20% en 35 minutos, del 20% al 30% en 20 min, se lava la columna con un 70% de B y finalmente se acondiciona en las condiciones iniciales durante 15 minutos. El volumen de muestra inyectado es de 200 μ l. Antes de la inyección, las muestras se pasan por un filtro Millipore (Waters) de 0,45 μ m.

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

Se utiliza un equipo de trampa iónica Esquire 3000 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). La muestra se inyecta en el nebulizador de electrospray a un flujo de 4 μ l/min, utilizando una bomba de jeringa tipo 22 (Harvard Apparatus, South Natick, MA, Estados Unidos). El equipo utiliza 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 50-1500 m/z y a una velocidad de 13000 Da/segundo. La interpretación de los espectros de MS en tandem para la identificación de las secuencias peptídicas se realiza con el programa Biotools 2.1 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania).

25 *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) consiste en una bomba cuaternaria, un inyector automático, un sistema de desgasificación para 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 μ m de tamaño de partícula) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos). 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 μ l de muestra, a una concentración de 1-2 mg/ml. Se utiliza un flujo de 0,8 ml/minuto con un gradiente lineal de 0% al 30% del disolvente B en A en 25 minutos. El eluyente se monitoriza a 214 nm, mediante espectrofotometría de masas, en las mismas condiciones que las indicadas en el apartado anterior, a excepción del hecho de que la inyección de la muestra mediante el nebulizador es de 60 μ l/min.

Estudio de la actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas

Se estudia el efecto de varios de los péptidos identificados y de algunos productos que los contienen (por ejemplo clara de huevo hidrolizada con pepsina durante 3 horas y la fracción del mismo menor de 3000 Da) sobre la presión arterial de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y de ratas Wistar-Kyoto (WKY), que son los controles normotensos para las SHR.

Este estudio se realiza con SHR (10) y WKY de 17-24 semanas de vida y peso 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. Para llevar a cabo las medidas de presión arterial sistólica (PAS) se utiliza un equipo de "tail cuff" (método del manguito en la cola) (Le5001, Letica) que proporciona automáticamente un valor digital de la PAS y registra y facilita la frecuencia cardíaca de los animales. Se realizan varias mediciones y se obtiene la media de todas ellas para conseguir un valor fiable de la PAS. Antes de colocar el manguito y el transductor en la cola de las ratas, éstas se exponen a una temperatura próxima a los 30°C para facilitar la dilatación de la arteria caudal. Además, para asegurar la fiabilidad de la medición, los animales se acostumbran al procedimiento 2 semanas antes de llevar a cabo el ensayo en cuestión.

La administración de los productos a ensayar se realiza mediante una sonda intragástrica en un margen de tiempo entre las 9 y las 10 h de la mañana. Las SHR utilizadas para el estudio tenían valores de PAS entre 230 y 280 mm Hg. Las WKY utilizadas para el estudio tenían en ese momento valores de PAS entre 160 y 200 mm Hg. Se toman periódicamente mediciones de la PAS de los animales, cada 2 horas, hasta las 8 horas después de la administración de los productos a ensayar; además, se tomó una medición de la PAS 24 horas después de la administración de estos productos. Como control negativo (para establecer la variación circadiana de la PAS en ratas sondadas) se utilizaron las mediciones de la PAS obtenidas en ratas a las que se había administrado mediante sonda intragástrica 1 ml de agua. Como control positivo, se utilizaron las mediciones de la PAS obtenidas en ratas a las que se había administrado mediante sonda intragástrica 50 mg/kg de Captopril (fármaco IECA prototipo). Esta dosis de Captopril se administró a cada rata en un volumen de 1 ml. Para establecer el efecto de la clara de huevo no hidrolizada sobre la presión arterial de los animales, se llevaron a cabo ensayos similares a los descritos anteriormente, en los que los animales se trataron mediante el mismo procedimiento con 200 mg/kg de clara de huevo previamente liofilizada (referencia).

Los resultados obtenidos se agrupan y se obtiene la media $\pm$ el error estándar de la media (ESM) para un mínimo de 9 ensayos homogéneos. Los datos de los animales tratados se comparan siempre con los datos que se consideran que son el control negativo. Para compararlos y obtener la significación estadística se utiliza el test t de Student para datos no apareados y se considera significativa la diferencia para valores de $p < 0,05$.

Breve descripción del contenido de las figuras

La figura 1 representa la disminución de la presión arterial sistólica (PAS), obtenida en ratas espontáneamente hipertensas, tras la administración mediante sonda intragástrica de 1 ml de agua (○), 50 mg/kg de Captopril (□), 200 mg/kg de clara de huevo (CH) (X), y diferentes dosis del hidrolizado de clara de huevo (HCH): 100 mg/kg (◆), 150 mg/kg (▲), 200 mg/kg (■), y 400 mg/kg (Δ). Los datos representan la media $\pm$ ESM para un mínimo de 9 animales. En el eje de abscisas se representa el tiempo, en horas, transcurrido desde la administración.

La figura 2 representa la disminución de la presión arterial sistólica (PAS), obtenida en ratas espontáneamente hipertensas, tras la administración mediante sonda intragástrica de 1 ml de agua (○), 50 mg/kg de Captopril (□) y diferentes dosis de la fracción inferior a 3000 Da del hidrolizado de clara de huevo ($F < 3000$ Da): 25 mg/kg (◆), 50 mg/kg (A) y 100 mg/kg (■). Los datos representan la media $\pm$ ESM para un mínimo de 9 animales. En el eje de abscisas se representa el tiempo, en horas, transcurrido desde la administración.

La figura 3A es un cromatograma obtenido utilizando cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC) a escala preparativa de la fracción inferior a 3000 Da producida mediante hidrólisis de clara de huevo con pepsina durante 3 h, en el que se seleccionan 9 fracciones (F1-F9), que fueron recogidas automáticamente. En el eje de abscisas se representa el tiempo en minutos.

La figura 3B representa la actividad IECA, expresada como la concentración proteica necesaria para inhibir el 50% de la enzima (IC_{50}), correspondiente a cada una de las 9 fracciones recogidas mediante la RP-HPLC a escala preparativa.

La figura 4 representa la disminución de la presión arterial sistólica (PAS), obtenida en ratas espontáneamente hipertensas, tras la administración mediante sonda intragástrica de 1 ml de agua (○), 50 mg/kg de Captopril (□) y diferentes dosis del péptido YAEERYPIL: 0,5 mg/kg (◆), 1 mg/kg (▲) y 2 mg/kg (■). Los datos representan la media $\pm$ ESM para un mínimo de 9 animales. En el eje de abscisas se representa el tiempo, en horas, transcurrido desde la administración.

La figura 5 representa la disminución de la presión arterial sistólica (PAS), obtenida en ratas espontáneamente hipertensas, tras la administración mediante sonda intragástrica de 1 ml de agua (○), 50 mg/kg de Captopril (□) y diferentes dosis del péptido RADHPFL: 0,5 mg/kg (◆), 1 mg/kg (▲) y 2 mg/kg (■). Los datos representan la media $\pm$ ESM para un mínimo de 9 animales. En el eje de abscisas se representa el tiempo, en horas, transcurrido desde la administración.

La figura 6 representa la disminución de la presión arterial sistólica (PAS), obtenida en ratas espontáneamente hipertensas, tras la administración mediante sonda intragástrica de 1 ml de agua (X), 50 mg/kg de Captopril (□) y diferentes dosis del péptido IVF: 1 mg/kg (◆), 2 mg/kg (A) y 4 mg/kg (■). Los datos representan la media $\pm$ ESM para un mínimo de 9 animales. En el eje de abscisas se representa el tiempo, en horas, transcurrido desde la administración.

La figura 7 representa la disminución de la presión arterial sistólica (PAS), obtenida en ratas Wistar-Kyoto normotensas, tras la administración mediante sonda intragástrica de 1 ml de agua (○), 50 mg/kg de Captopril (□), 200 mg/kg de CH (X), 400 mg/kg de HCH (●), 100 mg/kg de la fracción inferior a 3000 Da de HCH ($F < 3000$ Da) (Δ), 2 mg/kg del péptido YAEERYPIL (◆), 2 mg/kg del péptido RADHPFL (A) y 4 mg/kg péptido IVF (■). Los datos representan la media $\pm$ ESM para un mínimo de 9 animales. En el eje de abscisas se representa el tiempo, en horas, transcurrido desde la administración.

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 IECA y antihipertensiva, a partir de clara de huevo hidrolizada con pepsina a presión atmosférica

El hidrolizado se obtuvo utilizando como sustrato clara de huevo de gallina, procedente de huevos frescos, separada de la yema y liofilizada. Como enzima, se utilizó pepsina (E.C. 3.4.23.1. tipo A, 10000 U/mg de proteína), procedente de estómago de cerdo (Sigma). El sustrato se disolvió en agua a una concentración de 100 mg/ml y el pH se ajustó a 2,0 añadiendo HCl 1N. Se añadió pepsina (proporción enzima/sustrato 1/100, p/p). La hidrólisis se realizó a una

ES 2 303 090 T3

temperatura de 37°C durante 24 horas, a presión atmosférica (0,1 MPa). La desactivación de la pepsina se consiguió elevando el pH hasta 7,0 con NaOH 1N.

Se midió la actividad IECA en alícuotas recogidas tras diferentes tiempos de hidrólisis, 0, 30 minutos, 3, 5, 8 y 24 horas. Los resultados mostraron que la clara de huevo no hidrolizada no poseía actividad IECA ($IC_{50} > 750 \mu\text{g/ml}$), pero inhibe de manera activa la ECA tras diferentes tiempos de hidrólisis con pepsina, alcanzándose una importante inhibición tras 3 horas de hidrólisis ($IC_{50} = 200,9 \pm 1,5 \mu\text{g/ml}$; $55,3 \pm 2,1 \mu\text{g/ml}$; $72,2 \pm 2,3 \mu\text{g/ml}$; $43,07 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$; $40,2 \pm 0,9 \mu\text{g/ml}$; a los 30 min, 3, 5, 8 y 24 horas, respectivamente).

La fracción inferior a 3000 Da de clara de huevo hidrolizada con pepsina durante 3 horas se obtuvo mediante ultrafiltración a través de una membrana hidrofílica de 3000 Da (Centriprep, Amicon, Inc., Beverly, MA, Estados Unidos), centrifugando a 1900 g durante 40 minutos. Se midió la actividad IECA en el retenido (fracción de tamaño $> 3000 \text{ Da}$) y en el permeado (fracción de tamaño $< 3000 \text{ Da}$). Los valores de IC_{50} fueron, respectivamente 298,4 y 34,5 $\mu\text{g/ml}$. Esto demuestra que el permeado posee aproximadamente 10 veces más actividad IECA y que, por tanto, la actividad se debe fundamentalmente a péptidos de tamaño pequeño.

Se ensayó en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y en ratas normotensas Wistar-Kyoto (WKY) la actividad antihipertensiva de la clara de huevo hidrolizada con pepsina durante 3 horas y su fracción inferior a 3000 Da. Se administraron diferentes concentraciones de ambos ovoproductos liofilizados a los animales que, en el caso del hidrolizado, estaban entre 100 y 400 mg/kg, y en el caso de la fracción inferior a 3000 Da, entre 25 y 100 mg/kg.

Las Figuras 1 y 2 muestran, respectivamente, la disminución de la PAS obtenida en SHR en distintos momentos tras la administración de diferentes dosis de clara de huevo hidrolizada con pepsina durante 3 horas, y tras la administración de diferentes dosis de la fracción inferior a 3000 Da de dicho hidrolizado. Los resultados de estos ensayos con clara de huevo no hidrolizada (referencia) (200 mg/kg) se representan en la figura 1. En ésta, puede observarse que los valores de PAS correspondientes a la referencia son similares a los valores de PAS de los animales a los que se ha administrado agua. Estas figuras incluyen también la disminución de la PAS observada tras la administración de Captopril. El Captopril produce una pronunciada disminución de la PAS en las SHR. La disminución de la PAS es máxima 6 horas después de la administración del fármaco. El hidrolizado de clara de huevo y la fracción inferior a 3000 Da ocasionan significativas disminuciones dependientes de la dosis de la PAS en los animales. Los valores inferiores de la PAS después de la administración del hidrolizado de clara de huevo y la fracción inferior a 3000 Da de este hidrolizado, se observan también 6 horas después de su administración. Los valores de la PAS observados 24 horas después de las distintas administraciones son similares a los que tenían los animales antes de las mismas.

Con el fin de identificar los péptidos responsables de la actividad IECA y/o actividad antihipertensiva, la fracción inferior a 3000 Da obtenida tras la hidrólisis de clara de huevo con pepsina durante 3 horas se liofilizó y redisolvió en agua a una concentración de 50 mg/ml y se fraccionó mediante RP-HPLC a escala semipreparativa. Tal y como se muestra en la Figura 3 A, se recogieron 9 fracciones (después de aproximadamente 10-12 análisis), que se congelaron, liofilizaron y se mantuvieron a -20°C hasta su utilización. Cada fracción se disolvió en agua milli-Q y se midió la actividad IECA.

Tal como se muestra en la Figura 3 B, las subfracciones más activas fueron la 6, 7 y 8, que se analizaron por espectrometría de masas en tandem para determinar sus péptidos constituyentes. Con ese fin, las subfracciones peptídicas 6, 7 y 8, recogidas mediante RP-HPLC preparativo, se liofilizaron y se disolvieron a una concentración de 5-10 $\mu\text{g/ml}$ en una mezcla de acetonitrilo al 50% en agua que contiene un 0,3% de ácido fórmico. Los péptidos identificados se muestran en la tabla 2. Debe destacarse que todos los péptidos procedían de ovoalbúmina.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 303 090 T3

TABLA 2

Péptidos identificados en las subfracciones 6, 7 y 8 de la fracción inferior a 3000 Da de clara de huevo hidrolizada con pepsina durante tres horas

Fracción No.	Masa experimental	Masa teórica	Proteína	Posición	Aminoácidos	Secuencia No.
6	592,3	592,32	Ovoalbúmina	212-216	YQIGL	SEC ID No. 1
6	377,2	377,23	Ovoalbúmina	178-180	IVF ⁺	SEC ID No. 2
6	854,4	854,44	Ovoalbúmina	359-365	RADHPFL ⁺	SEC ID No. 3
6	365,2	365,20	Ovoalbúmina	99-101	FSL	SEC ID No. 4
7	721,3	721,37	Ovoalbúmina	256-261	ESIINF ⁺	
7	1001,4	1001,51	Ovoalbúmina	358-365	FRADHPFL ⁺	SEC ID No. 5
7	1152,3	1152,58	Ovoalbúmina	106-114	YAEERYPIL	SEC ID No. 6
8	757,2	757,41	Ovoalbúmina	84-89	RDILNQ	SEC ID No. 7
8	1040,2	1040,58	Ovoalbúmina	243-252	VLLPDEVSGL ⁺	
8	491,1	491,24	Ovoalbúmina	36-40	SALAM	SEC ID No. 8
8	487,1	487,26	Ovoalbúmina	144-147	ELIN ⁺	
8	1164,2	1164,59	Ovoalbúmina	125-134	YRGGLEPINF ⁺	

⁺ las secuencias se indican sólo con objetivos ilustrativos.

Ejemplo 2

Péptidos obtenidos mediante síntesis química con actividad IECA y antihipertensiva

Se sintetizaron químicamente todos los péptidos identificados mencionados en la Tabla 2 del ejemplo 1, mediante el método Fmoc en fase sólida con un sintetizador modelo 431A de Applied Biosystems Inc. (Überlingen, Alemania). La pureza de los péptidos sintéticos se verificó mediante RP-HPLC-MS/MS.

Se midió la actividad IECA de los péptidos sintéticos. La actividad encontrada se muestra en la tabla 3. Destacan por su actividad 8 péptidos con IC₅₀ inferiores a 450 µM y, sobre todo, las secuencias: SEC. ID. No. 2, SEC. ID. No. 3, SEC. ID. No. 5 y SEC. ID. No. 6, con IC₅₀ inferiores a 34 µM.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 303 090 T3

TABLA 3

Actividad IECA de péptidos identificados en las subfracciones 6, 7 y 8 de la fracción inferior a 3000 Da de clara de huevo hidrolizada con pepsina durante tres horas

Secuencia No.	Aminoácidos	IC ₅₀ (μM)
SEC ID No. 1	YQIGL	173,8
SEC ID No. 2 ⁺	IVF	33,9
SEC ID No. 3 ⁺	RADHPFL	6,2
SEC ID No. 4	FSL	172,9
SEC ID No. 5 ⁺	ESIINF ⁺	> 1000
SEC ID No. 6	FRADHPFL	3,2
SEC ID No. 7	YAEERYPIL	4,7
SEC ID No. 8	RDILNQ	435,7
	VLLPDEVSGL ⁺	> 1000
	SALAM	229,1
	ELIN ⁺	> 1000
	YRGGLEPINF	> 1000

⁺ las secuencias se indican sólo con objetivos ilustrativos.

Se ensayó la actividad antihipertensiva de los péptidos de SEC. ID. No. 2, SEC. ID. No. 3 y SEC. ID. No. 6, para lo cual se administraron diferentes dosis de los mismos a SHR y a WKY, siendo la dosis máxima utilizada siempre equivalente en unidades de actividad IECA a la dosis 50 mg/kg de la fracción inferior a 3000 Da del hidrolizado de clara de huevo. Los péptidos se disolvieron en agua destilada y se administró la dosis correspondiente a cada rata en un volumen de 1 ml.

Las Figuras 4, 5 y 6 muestran las disminuciones de la PAS obtenidas en SHR en diferentes momentos, tras la administración de diferentes dosis de los péptidos SEC. ID. No. 6, SEC. ID. No. 3 y SEC. ID. No. 2. Se puede observar que la administración de estos péptidos ocasiona una disminución dependiente de la dosis significativa de la PAS en estos animales. La disminución de la PAS es máxima 6 horas después de la administración de estos péptidos, y la disminución máxima obtenida es también similar para los diferentes péptidos.

La Figura 7 muestra, los cambios de la PAS obtenidos en ratas WKY en distintos momentos, tras la administración de los siguientes compuestos: 400 mg/kg del hidrolizado de clara de huevo, 100 mg/kg de la fracción inferior a 3000 Da del hidrolizado, 2 mg/kg del péptido de SEC. ID. No. 6, 2 mg/kg del péptido SEC. ID. No. 3, y 4 mg/kg del péptido SEC. ID. No. 2. También se incluyen los resultados obtenidos tras la administración de 50 mg/kg de Captopril. Puede observarse que ninguno de estos compuestos modifica la PAS de las ratas WKY cuando se administra la dosis más alta utilizada. Estos resultados significan que se pueden descartar posibles efectos indeseables de los productos ensayados sobre la presión arterial de sujetos normotensos.

Los resultados presentados muestran que los péptidos identificados por las secuencias SEC. ID. No. 2, SEC. ID. No. 3 y SEC. ID. No. 6, tienen un claro y pronunciado efecto antihipertensivo, que tras su administración aguda tiene una evolución con el tiempo similar al efecto antihipertensivo observado cuando se administran el hidrolizado de clara de huevo o la fracción inferior a 3000 Da de dicho hidrolizado.

Ejemplo 3

Péptidos obtenidos mediante síntesis química con actividad antioxidante

Se midió la actividad antioxidante de uno de los péptidos identificados, específicamente, la secuencia: SEC. ID. No. 6, mencionada en el ejemplo 1. La actividad encontrada se muestra a continuación:

$$TEAC_{YAEERYPIL(1 \text{ minuto})} = 0,8$$

$$TEAC_{YAEERYPIL(6 \text{ minutos})} = 1,2$$

$$TEAC_{YAEERYPIL(10 \text{ minutos})} = 1,3$$

ES 2 303 090 T3

Los resultados muestran, por tanto, que 1 mg de YAEERYPIL (SEC. ID. No. 6) presenta 1,3 veces más actividad antioxidante que 1 mg de Trolox.

Ejemplo 4

Obtención de péptidos bioactivos a partir de ovoalbúmina hidrolizada con pepsina a presión atmosférica

El hidrolizado se obtuvo utilizando como sustrato ovoalbúmina de grado VI (99% de pureza) (Sigma). El sustrato se disolvió en agua en una concentración de 100 mg/ml y el pH se ajustó a 2,0 añadiendo HCl 1N. En esta realización particular de la invención se añadió pepsina (E.C. 3.4.23.1. tipo A, 10000 U/mg de proteína), procedente de estómago de cerdo (Sigma) en una proporción enzima/sustrato 1/100, p/p). La hidrólisis se realizó a una temperatura de 37°C durante 3 horas, a presión atmosférica (0,1 MPa). La desactivación de la pepsina se consiguió elevando el pH hasta 7,0 con NaOH 1N.

La medición de la actividad IECA mostró que la ovoalbúmina no hidrolizada no posee actividad IECA ($IC_{50} > 750 \mu\text{g/ml}$), pero inhibe la enzima después de 3 horas de hidrólisis con pepsina ($IC_{50} = 129,0 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$). El hidrolizado obtenido de esta manera se analizó mediante RP-HPLC-MS/MS. Se encontraron, al menos, las siguientes secuencias: SEC. ID. No. 1, SEC. ID. No. 2, SEC. ID. No. 3, SEC. ID. No. 4, SEC. ID. No. 5, SEC. ID. No. 6, SEC. ID. No. 7 y SEC. ID. No. 8. Entre éstas, las secuencias SEC. ID. No. 2, SEC. ID. No. 3, SEC. ID. No. 5 y SEC. ID. No. 6 poseen IC_{50} inferiores a $34 \mu\text{M}$ (ejemplo 2). Las SEC. ID. No. 2, SEC. ID. No. 3 y SEC. ID. No. 6 presentan también actividad antihipertensiva en ratas (ejemplo 2), y la SEC. ID. No. 6 posee actividad antioxidante frente a radicales libres (ejemplo 3).

Ejemplo 5

Obtención de péptidos bioactivos a partir de ovoalbúmina hidrolizada con pepsina bajo condiciones de alta presión hidrostática

El hidrolizado se obtuvo utilizando como sustrato ovoalbúmina de grado VI (99% de pureza) (Sigma). Como enzima, se añadió pepsina (E.C. 3.4.23.1. tipo A, 10000 U/mg de proteína), procedente de estómago de cerdo (Sigma). El sustrato se disolvió en agua a una concentración de 2 mg/ml y el pH se ajustó a 2,0 añadiendo HCl 1N. Se añadió pepsina (proporción enzima/sustrato 1/20, p/p). La hidrólisis se realizó a una temperatura de 37°C durante 30 min, a diferentes presiones hidrostáticas (100, 200, 300 y 400 MPa). La desactivación de la pepsina se consiguió elevando el pH hasta 7,0 con NaOH 1N.

Los tratamientos con alta presión se realizaron en un equipo discontinuo de presión hidrostática (900 HP Eurotherm Automation) con capacidad para 2350 ml, que alcanza una presión de 500 MPa. La cámara de alta presión consiste en un cilindro de acero inoxidable, lleno del medio transmisor de la presión (agua), en cuyo interior se introduce la mezcla de sustrato y enzima, envasada en un tubo de plástico Eppendorf sin dejar ninguna cámara de aire. El equipo alcanza la presión deseada a una velocidad de 2,5 MPa/segundo y, tras el tratamiento, desciende a cero a la misma velocidad. El equipo va acompañado de un baño auxiliar que, mediante la circulación de agua a través de una camisa exterior que rodea al cilindro, permite el tratamiento a temperaturas desde -20°C hasta 95°C. La temperatura del proceso se controla mediante un termopar sumergido en el medio transmisor de la presión. [0061] Los hidrolizados obtenidos de esta manera se analizaron mediante RP-HPLC-MS/MS. Se encontraron, al menos, las siguientes secuencias: SEC. ID. No. 3, SEC. ID. No. 5 y SEC. ID. No. 6 que, como se indicó en el ejemplo 2, poseen IC_{50} inferiores a $7 \mu\text{M}$. Las SEC. ID. No. 3 y SEC. ID. No. 6 presentan también actividad antihipertensiva en ratas (ejemplo 2), y la SEC. ID. No. 6 posee actividad antioxidante frente a radicales libres (ejemplo 3). Este ejemplo muestra cómo el uso de altas presiones hidrostáticas permite obtener hidrolizados que contienen péptidos activos más rápidamente que realizando las hidrólisis a presión atmosférica. Cabe destacar que no se obtuvo, bajo estas condiciones, la SEC. ID. No. 2, lo que podría tener incidencia en la aplicabilidad industrial de los hidrolizados.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se muestra únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido una gran precaución a la hora de recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 0185984 A [0004]
- US 6514941 B [0004]
- JP 5331190 B [0008]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

• T. **TAKANO**. Milk derived peptides and hypertension reduction. *International Dairy Journal*, 1998, vol. 8, 375-381 [0004]

• K. **SUETSUNA**; H. **UKEDA**; H. **OCHI**. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2000, vol. 11, 128-131 [0005]

• S. G. **RIVAL**; S. **FORNAROLI**; C. G. **BOERIU**; H. J. **WICHERS**. Caseins and casein hydrolysates. I. Lipoxygenase inhibitory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, vol. 49, 287-294 [0005]

• H. M. **CHEN**; K. **MURAMOTO**; F. **YAMAUCHI**; K. **FUJIMOTO**; K. **NOKIHARA**. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, vol. 46, 49-53 [0005]

• F. **BONOMI**; A. **FIOCCHI**; H. **FRØKLÆR**; A. **GAIASCHI**; S. **LAMETTI**; C. **POESI**; P. **RASMUSSEN**; P. **RESTANI**; P. **ROVERE**. Reduction of immunoreactivity of bovine β -lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. *Journal of Dairy Research*, 2003, vol. 70, 51-59

• Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Journal of Food Science*, 2000, vol. 65, 564-569 [0007]

• H. **FUJITA**; M. **YOSHIKAWA**. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology*, 1999, vol. 44, 123-127 [0007]

• H. **FUJITA**; H. **USUI**; K. **KURAHASHI**; M. **YOSHIKAWA**. Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin B1 agonist peptide derived from ovalbumin. *Peptides*, 1995, vol. 16, 785-790 [0008] [0020]

• H. **FUJITA**; R. **SASAKI**; M. **YOSHIKAWA**. Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from albumin, by emulsification in egg phosphatidyl-choline. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1995, vol. 59, 2344-2345 [0008]

• N. **MATOKA**; H. **USUI**; H. **FUJITA**; M. **YOSHIKAWA**. A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Letters*, 1999, vol. 452, 181-184 [0008]

• N. **MATOKA**; Y. **YAMADA**; H. **USUI**; R. **NAKAGIRI**; M. **YOSHIKAWA**. Designing potent derivatives of ovokinin (2-7), an anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2001, vol. 65, 736-739 [0009]

• Y. **YAMADA**; N. **MATOKA**; H. **USUI**; K. **ONISHI**. Design of a highly potent anti-hypertensive peptide based on ovalbumin (2-7). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2002, vol. 66, 1213-1217 [0009]

• A. **PIHLANTO-LIPPÄLÄ**; T. **ROKKA**; H. **KORHONEN**. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International dairy Journal*, 1998, vol. 8, 325-331 [0018]

• H. **FUJITA**; K. **YOKOYAMA**; M. **YOSHIKAWA**. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Journal of Food Science*, 2000, vol. 65, 564-569 [0021]

• M. **MAENO**; N. **YAMAMOTO**; T. **TAKANO**. Identification of an anti-hypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 1996, vol. 79, 1316-1321 [0021]

• D. W. **CUSHMAN**; H. S. **CHEUNG**. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 1971, vol. 20, 1637-1648 [0024]

• Y. K. **KIM**; S. **YOON**; D. Y. **YU**; B. **LÖNNERDAL**; B. H. **CHEUNG**. Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α s1-casein expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Dairy Research*, 1999, vol. 66, 431-439 [0024]

• R. **RE**; N. **PELLEGRINI**; A. **PROTEGGENTE**; A. **PANNALA**; M. **YANG**; C. **RICE-EVANS**. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biological Medicine*, 1999, vol. 26, 1231-1237 [0029]

• F.W.P.C. **VAN OVERLVELD**; G.R.M.M. **HAENEN**; J. **RHEMREV**; J.P.W. **VERMEIDEN**; A. **BAST**. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chemical and Biological Interactions*, 2000, vol. 127, 151-161 [0031]

REIVINDICACIONES

1. Producto bioactivo identificado a partir de hidrólisis enzimática de ovoalbúmina **caracterizado** porque:

- posee actividad IECA *in vitro* y/o actividad antihipertensiva *in vivo* y/o actividad antioxidante; y

- deriva de la región 36 a 216 de la ovoalbúmina, con un peso molecular entre 365,2 y 1152,58 y seleccionada del siguiente grupo: SEC. ID. No. 1, SEC. ID. No. 4, SEC. ID. No. 6, SEC. ID. No. 7 y SEC. ID. No. 8.

2. Composición **caracterizada** porque contiene al menos un péptido definido en la reivindicación 1, o combinaciones de dichos péptidos.

3. Composición según la reivindicación 2, **caracterizada** porque se obtiene mediante un procedimiento de síntesis química o enzimática o mediante procedimientos recombinantes.

4. Procedimiento para producir cualquiera de los productos bioactivos o composiciones descritos en las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque

a. se obtienen mediante hidrólisis del material de partida que sería cualquier sustrato que contenga ovoalbúmina o una o más proteínas o péptidos, de origen animal o procedente de microorganismos, cuya secuencia de aminoácidos incluye la secuencia de aminoácidos de los péptidos bioactivos de interés indicados en la reivindicación 1,

b. disolver o dispersar dicho material de partida, a una concentración apropiada, en agua o una solución tampón, a un pH adecuado para la acción de la enzima proteolítica,

c. utilizar cualquier enzima proteolítica capaz de romper la proteína presente en el material de partida y proporcionar los péptidos de interés; o microorganismos proteolíticos que producen una fermentación del sustrato, y

d. el tiempo de reacción estaría entre 10 minutos y 24 horas.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque dicho sustrato de la etapa a) se selecciona entre ovoalbúmina pura, clara de huevo y el huevo entero en sus diferentes formas de presentación, u ovoproductos destinados a hostelería y restauración, complementos dietéticos para deportistas y ovoproductos para alimentación animal.

6. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque dicha enzima proteolítica de la etapa b) es pepsina a pH 2,0-3,0.

7. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el tiempo de reacción de la etapa d) se encuentra entre 10 minutos y 3 horas.

8. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque se utilizan presiones hidrostáticas elevadas entre 100 y 1000 MPa.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque dicha presión hidrostática elevada es de 400 MPa.

10. Composición según la reivindicación 2, **caracterizada** porque comprende el hidrolizado enzimático completo, cualquiera de sus fracciones, o una purificación de los mismos, en la que la composición contiene al menos uno de los péptidos descritos en la reivindicación 1.

11. Composición **caracterizada** porque contiene los péptidos o sales farmacéuticamente aceptables o sus mezclas de cualquiera de los péptidos descritos en la reivindicación 1.

12. Composición farmacéutica **caracterizada** porque comprende al menos uno de los péptidos con actividad IECA *in vitro* y/o actividad antihipertensiva *in vivo* y/o actividad antioxidante descritos en la reivindicación 1.

13. Aditivo, ingrediente o suplemento alimentario funcional **caracterizado** porque comprende al menos uno de los péptidos con actividad IECA *in vitro* y/o actividad antihipertensiva *in vivo* y/o actividad antioxidante descritos en la reivindicación 1.

14. Producto alimentario funcional **caracterizado** porque comprende al menos uno de los péptidos con actividad IECA *in vitro* y/o actividad antihipertensiva *in vivo* y/o actividad antioxidante descritos en la reivindicación 1.

15. Uso de la composición farmacéutica descrita en la reivindicación 12 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la hipertensión.

ES 2 303 090 T3

16. Uso de aditivo, ingrediente, o suplemento alimentario funcional descrito en la reivindicación 13 en la preparación de un producto alimentario funcional favorable para reducir la hipertensión.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

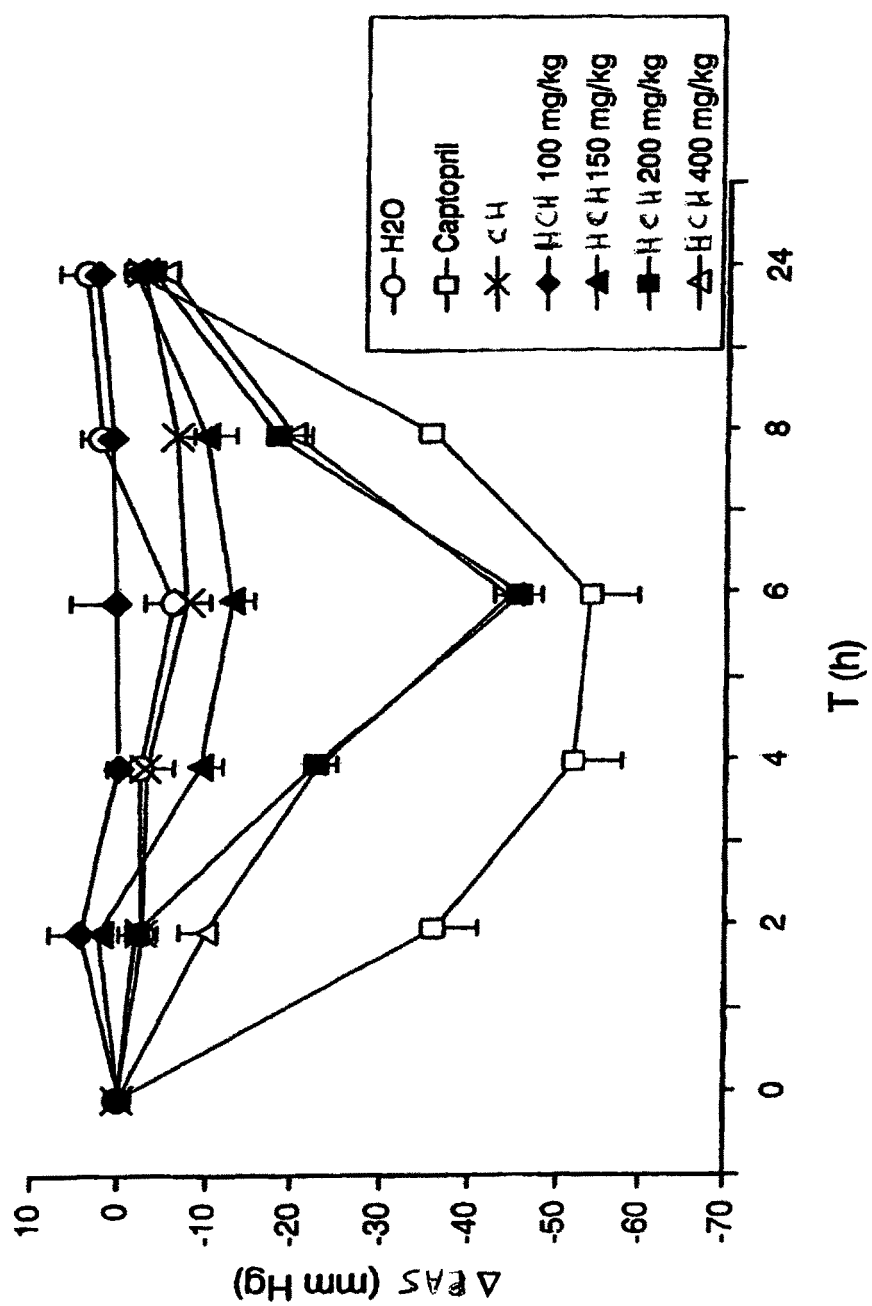


FIG. 2

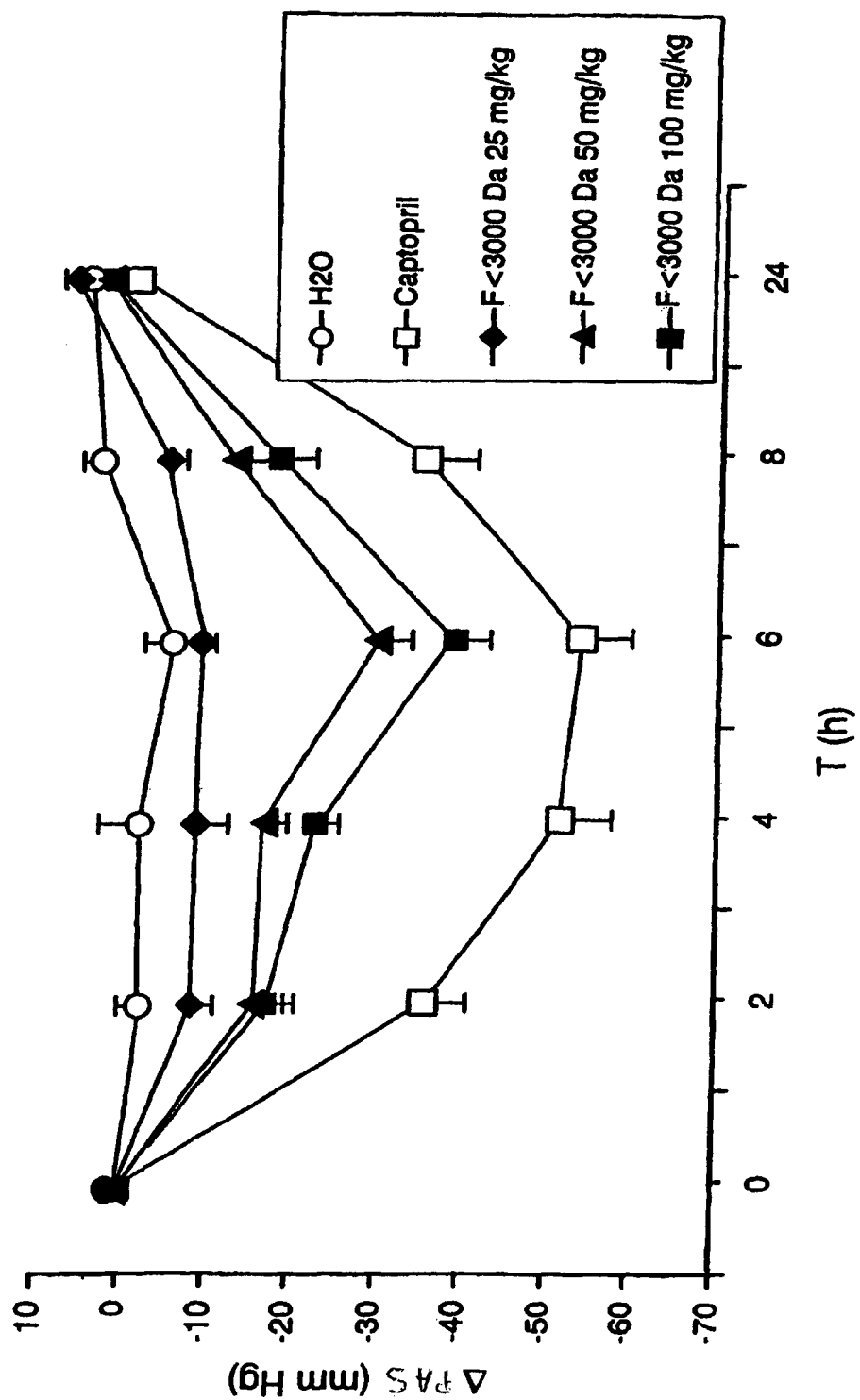


FIGURA 3 A

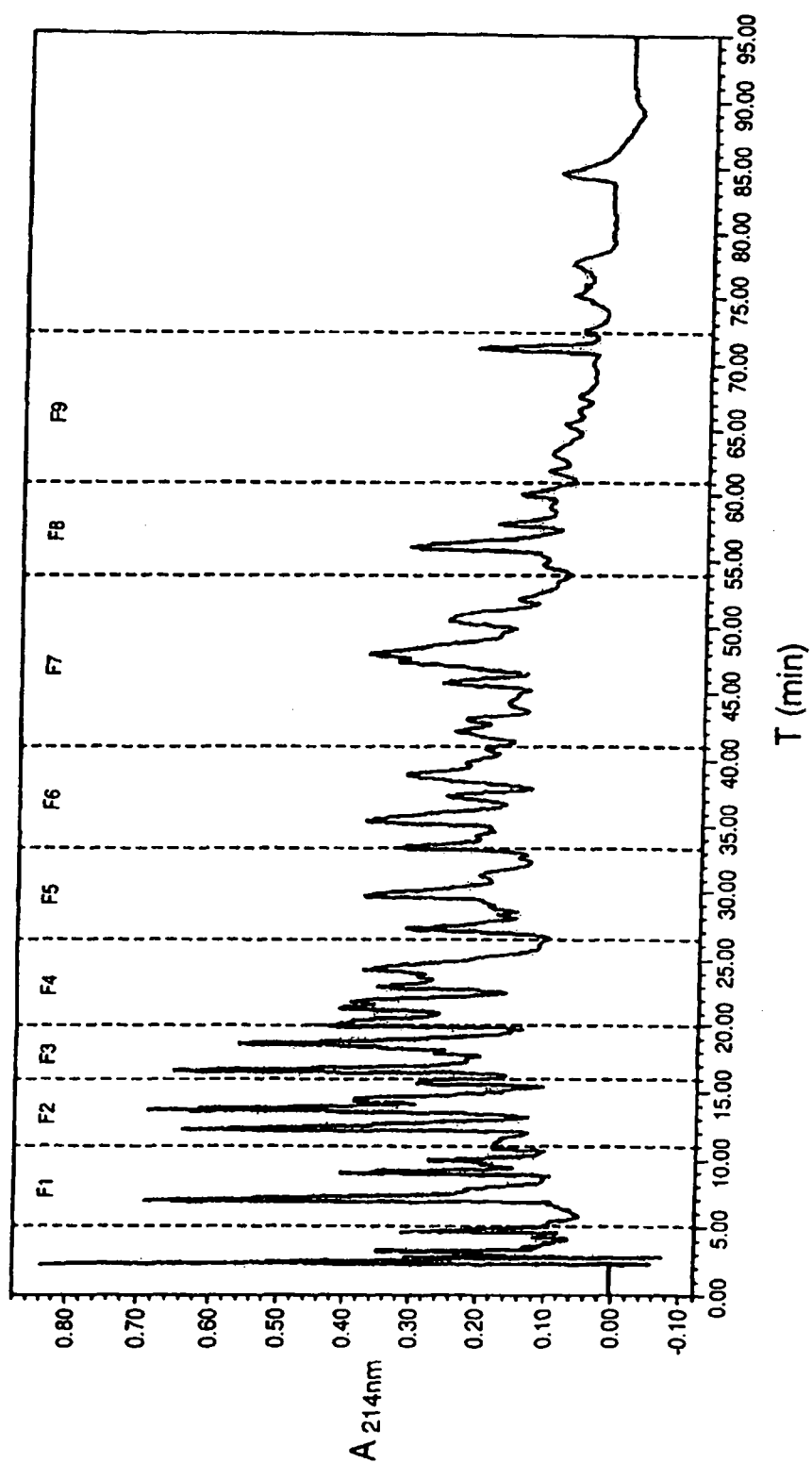


FIGURA 3 B

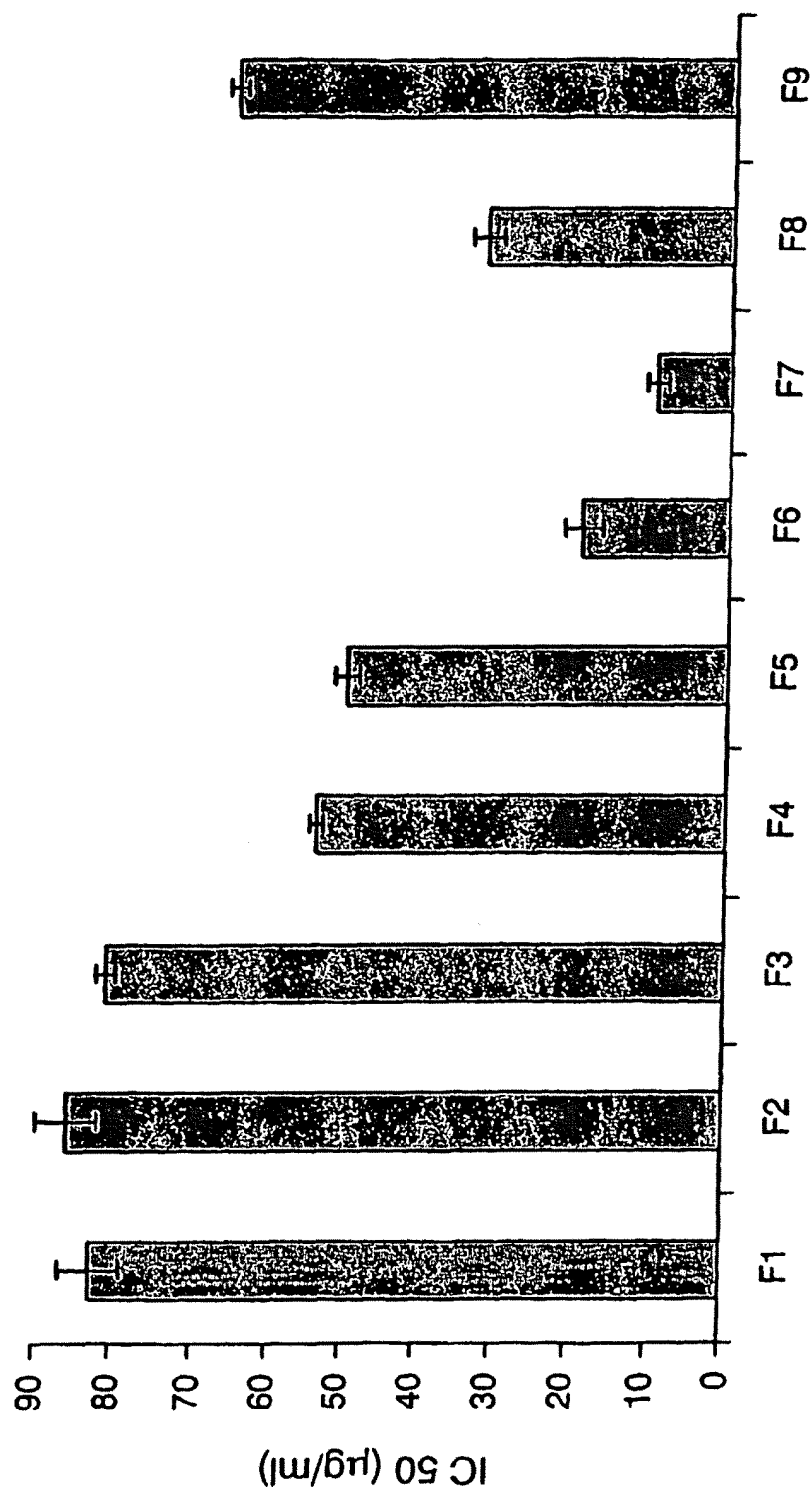


FIGURA 4

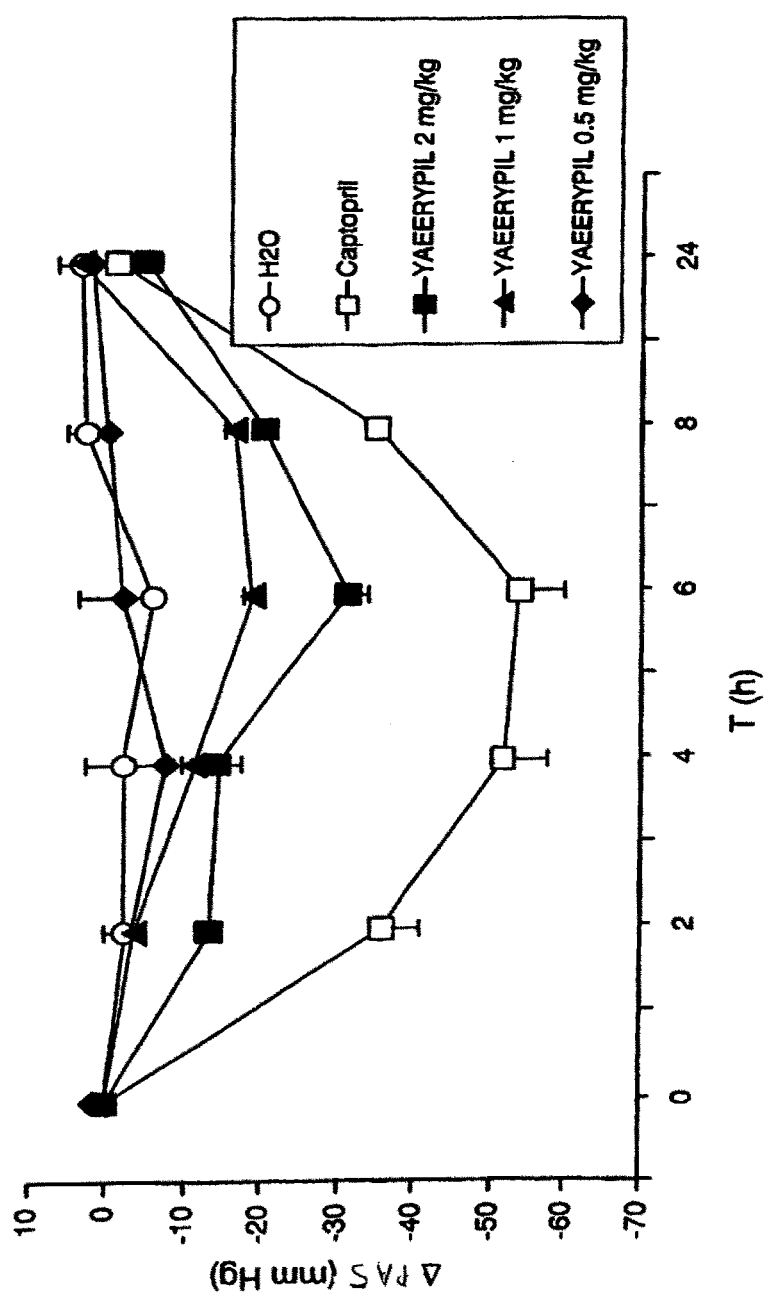


FIGURA 5

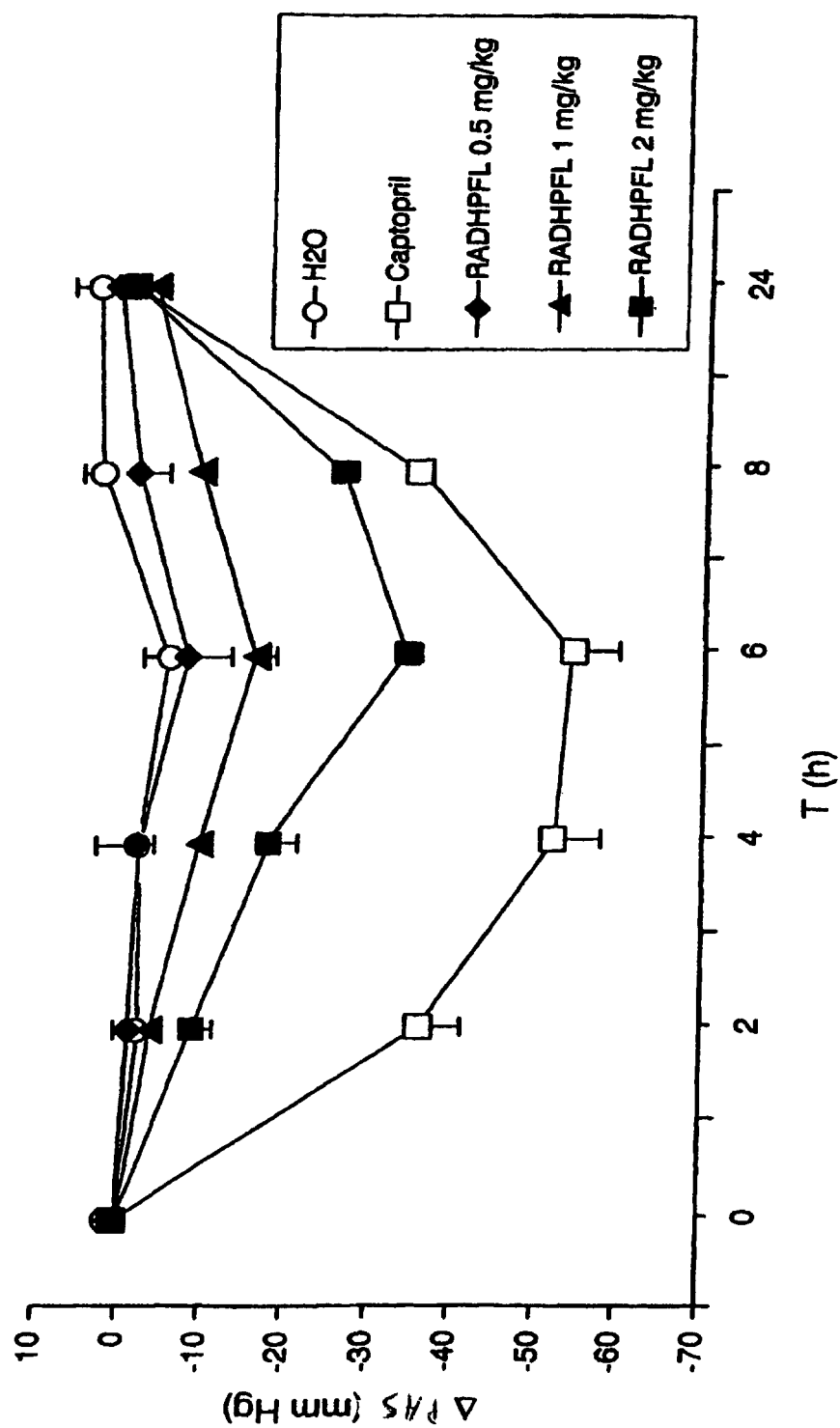


FIGURA 6

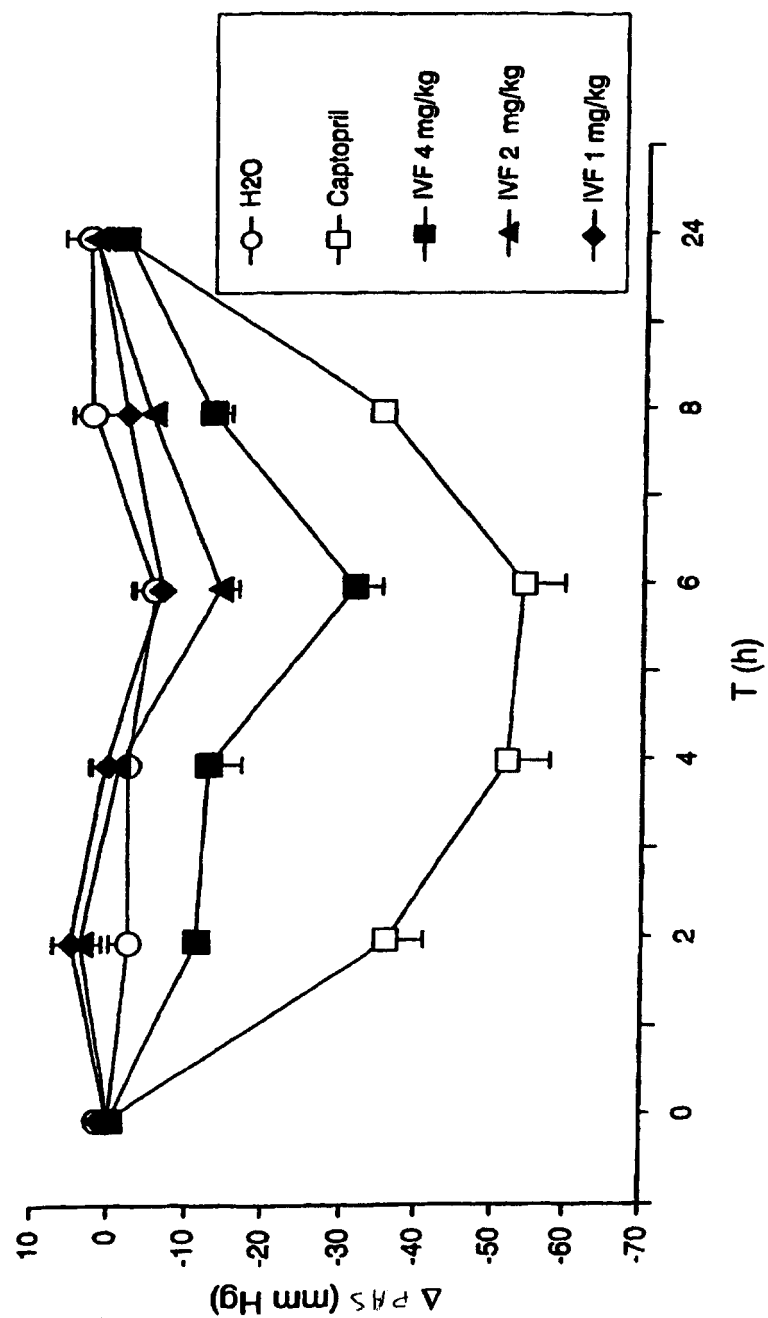
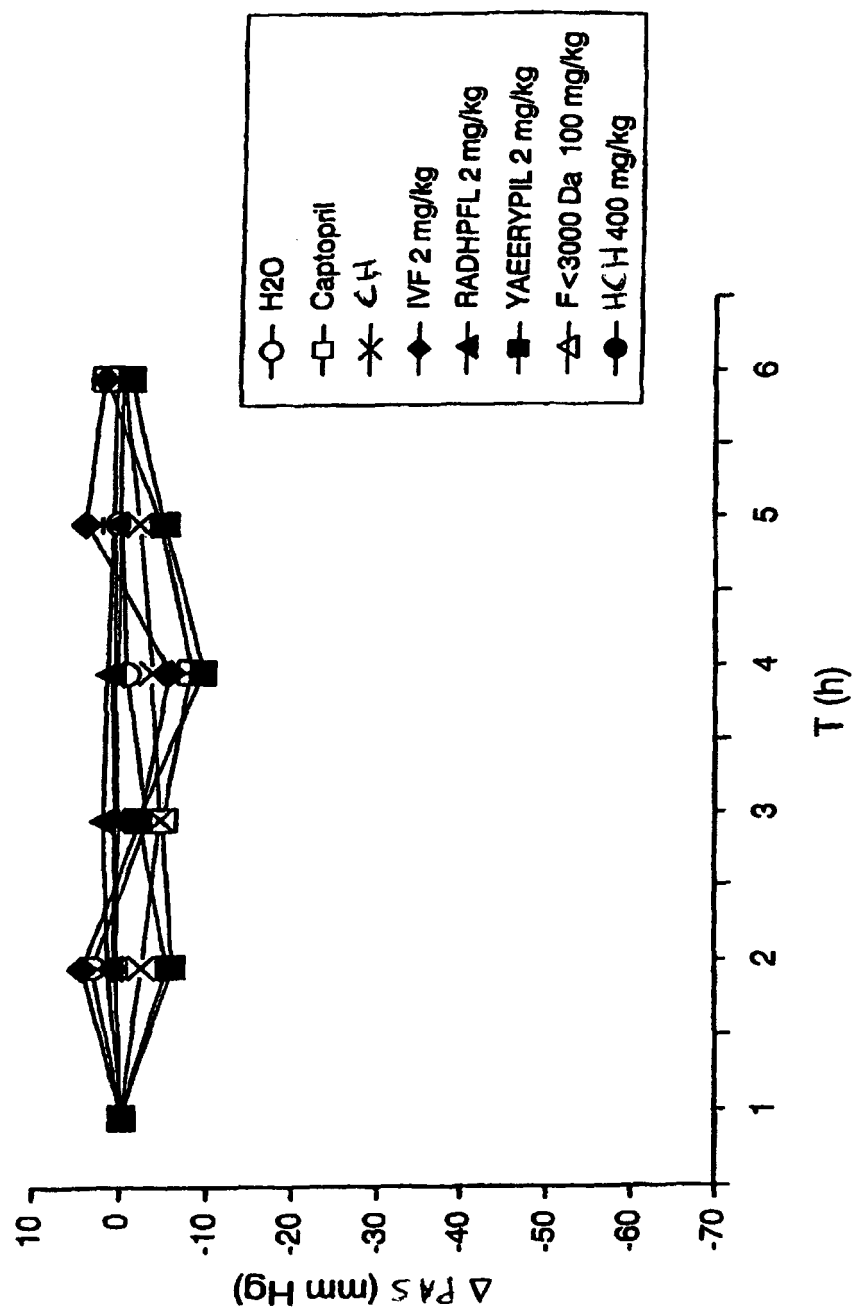


FIGURA 7



ES 2 303 090 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
López-Alonso Fandiño, Rosina
5 Ramos González, Mercedes
Recio sánchez, Isidra
Miguel castro, Marta
Aleixandre de Artiñano, Amaya
- 10 <120> PÉPTIDOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE PROTEINAS DE LA CLARA DE HUEVO MEDIANTE HI-
DRÓLISIS ENZIMÁTICA
- 15 <130> BIOHCH
- <160> 8
- 20 <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
<211> 5
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial
- <400> 1
- 30 Tyr Gln Ile Gly Leu
1 5
- <210> 2
35 <211> 3
<212> PRT
<213> secuencia artificial
- 40 <400> 2
- Ile Val Phe
1
- 45 <210> 3
<211> 7
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial
- <400> 3
- 55 Arg Ala Asp His Pro Phe Leu
1 5
- <210> 4
60 <211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 65 <400> 4
- Phe Ser Leu
1

ES 2 303 090 T3

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<400> 5

10 Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu
1 5

<210> 6

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <400> 6

Tyr Ala Glu Glu Arg Tyr Pro Ile Leu
1 5

25 <210> 7

<211> 6

<212> PRT

30 <213> secuencia artificial

<400> 7

35 Arg Asp Ile Leu Asn Gln
1 5

<210> 8

<211> 5

40 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<400> 8

45 Ser Ala Leu Ala Met
1 5

50

55

60

65