(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 309 463**

(51) Int. Cl.:
C07K 5/08 (2006.01)
C07K 5/10 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
A23J 3/34 (2006.01)
A23J 3/16 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/01 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04252588 .1**
(96) Fecha de presentación : **04.05.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1593685**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **09.11.2005**

(54) Título: **Péptidos antioxidantes de proteína de soja.**

(73) Titular/es: **KRAFT FOODS HOLDINGS, Inc.**
Three Lakes Drive
Northfield, Illinois 60093, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

(72) Inventor/es: **Gao, Song;**
Miller, Miranda y
Han, Xiao Quing

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

(74) Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Péptidos antioxidantes de proteína de soja.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos antioxidantes que resultan de la digestión proteolítica de la proteína de soja. Los péptidos pueden usarse como aditivos en composiciones farmacéuticas o dietéticas para proteger los compuestos de la degradación oxidativa. Alternativamente, los péptidos pueden usarse en sí mismos como o bien agentes terapéuticos o bien complementos dietéticos.

Antecedentes de la invención

Se ha notificado que la proteína de soja tiene un número de importantes efectos promotores de la salud, incluyendo una capacidad para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular y cáncer (Potter, Nutr. Rev. 56:231-235 (1998); Greeves, J. Nutr. 130: 820-826 (2000); J. Nutr. 125:698S-708S (1995); J. Nutr. 125:7335 S-7435 (1995)). Una posible explicación para estos efectos se sugiere por el hecho de que los péptidos generados a partir de soja usando proteasas han mostrado tener actividad antioxidante (Chen *y cols*. J. Agric. Food Chem. 46:49-53 (1998); Chen *y cols*. J. Agric. Food Chem. 43:574-578 (1995); Suetsuna, J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci. 52:225-228 (1999); véase también Zhang, *y cols*. Ann. NY Acad. Sci. 864: 640-645 (1998)). Eliminando radicales libres y especies oxidantes generadas en el transcurso de reacciones *in vivo*, los péptidos pueden ayudar a proteger frente a procesos patogénicos que implican la inactivación de enzimas, la mutación de ADN y desnaturalización de proteínas (Szweda, *y cols*. J. Biol. Chem. 268:3342 (1993); Reiss *y cols*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48:921 (1972)).

Además de tener un uso clínico potencial en la reducción del riesgo de que los pacientes desarrollen enfermedad cardíaca (Perticone, *y cols*., Diabetes 50):159-165 (2001); Krinksy, Annu. Rev. Nutr. 13:561 (1993)) y cáncer (Melov, *y cols*., Science 289:1567-1569 (2000)), los péptidos antioxidantes pueden usarse para evitar daño oxidativo en productos alimenticios y farmacéuticos. En los productos alimenticios, los péptidos pueden usarse para evitar la oxidación de aceites y grasas, lo que se asocia con la pérdida de valor nutritivo y que causa rancidez. En los productos farmacéuticos, deben ayudar a mantener la integridad estructural de los fármacos expuestos a radicales de oxígeno destructivos.

El documento WO 03/097791 proporciona un método de identificación de alfa-galactosidasas alcalinas. También se proporcionan secuencias de polinucleótidos novedosas que codifican para polipéptidos que tienen una actividad alfa-galactosidasa alcalina, oligonucleótidos y análogos de oligonucleótidos derivados de las secuencias de polinucleótidos, péptidos y análogos de péptidos, anticuerpos que reconocen los mismos y métodos para el uso de los mismos. Sin embargo, no se menciona en el documento WO 03/097791 que los péptidos dados a conocer en este respecto presenten propiedades antioxidantes.

Sonnet *y cols*, Tetrahedron Letters 44 (2003) págs. 3293-3296 “First synthesis of segetalins B and G: two cyclopentapeptides with estrogen-like activity” dan a conocer la síntesis de dos segetalinas B y G. Los péptidos lineales correspondientes se sintetizaron usando métodos SPPS de flujo continuo automatizados convencionales. Las posiciones de cierre de anillo se investigaron para la segetalina B. La mejor actividad de cierre de anillo se encontró entre Val y Gly. No se menciona en ese artículo de revista que cualquiera de los péptidos dados a conocer en este respecto presenta propiedades antioxidantes.

Saito *y cols*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 2003, 51, págs. 3668-3674 dan a conocer dos series de bibliotecas tripeptídicas combinatorias, basándose en un péptido antioxidante aislado de una hidrolasa de proteína de soja. Una era una biblioteca de 108 péptidos que contenía residuos o bien His o bien Tyr. Otra era una biblioteca de 114 péptidos relacionada con Pro-His-His, que se identificó como un núcleo activo del péptido antioxidante. Las propiedades antioxidantes de estas bibliotecas se examinaron mediante varios métodos, tales como la actividad antioxidante frente a la peroxidación del ácido linoleico, la actividad reductora, la actividad de eliminación de radicales y la actividad de eliminación de peroxinitrito. Los tripéptidos que contienen dos Tyr mostraron actividades más altas que los tripéptidos que contienen dos His en la peroxidación del ácido linoleico. Tyr-His-Tyr mostró un efecto sinérgico fuerte con los antioxidantes fenólicos. Sin embargo, el tripéptido sólo tuvo una actividad reductora mínima y una actividad de eliminación de peroxinitrito moderada. Los tripéptidos que contienen cisteína mostraron una actividad de eliminación de peroxinitrito fuerte. El cambio de o bien el extremo N-terminal o bien el extremo C-terminal de Pro-His-His por otros restos de aminoácido no alteró significativamente su actividad antioxidante. Los tripéptidos que contienen restos Trp o Tyr en el extremo C-terminal tuvieron actividades de eliminación de radicales fuertes, pero una actividad de eliminación de peroxinitrito muy débil. Los presentes resultados permiten entender por qué los digestos de proteína tienen tal variedad de propiedades antioxidantes.

Herraiz *y cols*., Free Radical Research (marzo de 2004) volumen 38, número 3, páginas 323-31 da a conocer una serie de experimentos en los que un total de veintinueve indoles y análogos se examinaron para determinar sus propiedades como antioxidantes y eliminadores de radicales frente al catión radical ácido 2-2’-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ABTS. Sólo con unas pocas excepciones, los indoles reaccionaron de una manera no específica y extinguieron este radical a pH fisiológico proporcionando ABTS. Las indolaminas como triptamina, serotonina y metoxitriptamina, neurohormonas (melatonina), fitohormonas (ácido indolacético y ácido indolpropiónico), aminoácidos

indólicos como L-triptófano y derivados (N-acetiltriptófano, L-abrina, éster etílico de triptófano), alcoholes indólicos (triptofol e indol-3-carbinol), péptidos pequeños que contienen triptófano, y alcaloides tetrahidro-beta-carbolina (piridoindol) como el compuesto de la glándula pineal pinolina, actuaron como eliminadores de radicales y antioxidantes en un ensayo de ABTS que medía la actividad antioxidante total. Sus valores de capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) oscilaron desde 0,66 hasta 3,9 mM, normalmente más altos que para Trolox y ácido ascórbico (1 mM). Los valores antioxidantes más altos se determinaron para melatonina, 5-hidroxitriptófano, trp-trp y 5-metoxitriptamina. Se consumieron compuestos de indol activos durante la reacción con ABTS y algunos tetrahidropiridoindoles (por ejemplo harmalina y éster etílico del ácido 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro-β-carbolina-3-carboxílico) proporcionaron las correspondientes β-carbolinas completamente aromáticas (piridoindoles), que no eliminaron el ABTS. La actividad de eliminación de radicales de indoles frente a ABTS fue más alta a pH fisiológico que a pH bajo. Estos resultados apuntaron a los compuestos estructurales con un resto indol como una clase de eliminadores de radicales y antioxidantes. Esta actividad puede ser de significancia biológica dando las concentraciones fisiológicas y la distribución corporal de algunos indoles.

El documento EP0657520 proporciona un antioxidante seguro aplicable a comidas, medicinas, cuasi-fármacos y otros productos. El antioxidante contiene un principio activo que comprende una sustancia antioxidante sola o una mezcla de la misma con un inhibidor de oxidación, seleccionándose dicha sustancia antioxidante del grupo que consiste en productos de descomposición de lactoferrinas, péptidos aislados de los productos de descomposición anteriores, péptidos sintéticos que tienen cada uno la misma secuencia de aminoácidos que la de cualquiera de los péptidos sintéticos y mezclas arbitrarias de esos compuestos. Este antioxidante tiene un efecto excelente de inhibir la oxidación de diversos lípidos, es sumamente seguro para alimentos y fármacos, y presenta un efecto antioxidante incluso en una pequeña cantidad, de manera que apenas afecta al gusto, etc. del alimento o similares.

El documento JP 48-014942 da a conocer un hidrolizado de proteína que puede añadirse a alimentos para retardar la oxidación de aceites y grasas en esas alimentos. La eficacia del hidrolizado se demostró añadiendo el 3-5% del hidrolizado a una disolución de alcohol al 20% de ácido linoleico que dio como resultado un retraso significativo en la producción de peróxido. El hidrolizado se formó mezclando 0,3 g de proteasa con 100 g de proteína de soja en 1,2 litros de agua. La mezcla se incubó a 45ºC durante 24 h. El hidrolizado resultante, tras el secado, contenía el 1,3% de aminoácidos y el 84,2% de péptidos.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el aislamiento y la caracterización de péptidos derivados de proteína de soja que tienen un alto grado de actividad antioxidante. Estos péptidos pueden incluirse en composiciones farmacéuticas o dietéticas con el fin de eliminar radicales libres y evitar la descomposición oxidativa de compuestos.

Ejemplos de tales péptidos consisten en una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos: GVAW (SEQ ID NO:1); GVAWW (SEQ ID NO:2); GVAWWM (SEQ ID NO:3); GVAWWMY (SEQ ID NO:4); GVAWWM* y GVAWWM*Y; en las que el símbolo M* se refiere a sulfóxido de metionina y también puede abreviarse como o bien Met(O) o bien MetS(O). Todas estas secuencias se muestran como que comienzan en el extremo N terminal (a la izquierda) y que terminan en el extremo C terminal (a la derecha). Los péptidos sólo contienen los l-aminoácidos que en la técnica se reconocen comúnmente que están presentes en las proteínas de mamíferos o plantas.

Por tanto, según la presente invención se proporciona un método de reducción de la degradación oxidativa de grasas o aceites en una composición, que comprende añadir a dicha composición una cantidad eficaz de una proteína aislada que consiste en cualquiera de las siguientes secuencias:

GVAW;

GVAWW;

GVAWWM;

GVAWWMY;

GVAWWM*; y

GVAWWM*Y.

Los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos representadas mediante SEQ ID NO:1 - SEQ ID NO:4, así como los péptidos que contienen sulfóxido de metionina, parecen ser todos el resultado de la digestión proteolítica de la subunidad G1, G2 o G3 de glicinina (la fracción 11S de aislado de proteína de soja). Los péptidos restantes parecen resultar de la digestión del precursor G4 de glicinina, el precursor G5 de glicinina, el precursor del polipéptido II de la citocromo C oxidasa o el precursor de la proteína de unión a sacarosa de 62 K, todos los cuales tienen secuencias que se conocen en la técnica. Los péptidos pueden obtenerse tratando aislado de proteína de soja, concentrado de proteína de soja y harina de soja usando los procedimientos descritos en el presente documento o, alternativamente, pueden sintetizarse usando métodos en fase sólida o líquida que son rutinarios en la técnica de química de péptidos.

La expresión “péptido aislado” tal como se usa en el presente documento se refiere a un péptido que se ha separado de otros componentes biológicos que lo acompañan y normalmente debería comprender al menos el 85% de una muestra, prefiriéndose porcentajes mayores. La pureza de las preparaciones puede evaluarse usando procedimientos convencionales tales como electroforesis, cromatografía y centrifugación analítica.

La expresión “que consiste esencialmente en” incluye péptidos que tienen las secuencias exactas mostradas así como péptidos que no difieren sustancialmente de aquellos mostrados o bien en términos de estructura o bien de función. Se reconoce bien que las sustituciones de aminoácidos conservativas, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido ácido, básico o neutro por otro, pueden hacerse a menudo sin afectar a la actividad biológica de un péptido o una proteína. De manera similar, a menudo es posible añadir uno o más aminoácidos al extremo N o C terminal de péptidos sin reducir sustancialmente la actividad. Variaciones menores en secuencia de esta naturaleza se abarcan mediante la expresión “que consiste esencialmente en” siempre que estos cambios no reduzcan sustancialmente la actividad antioxidante. Para los fines de la presente invención, las modificaciones en secuencia se limitan a la sustitución de no más de un aminoácido por péptido y/o la adición de no más de uno o dos aminoácidos al extremo N y/o C terminal de un péptido. Cualquier cambio estructural que reduce sustancialmente la actividad antioxidante (por ejemplo, en un 15% o más tal como se determinó usando uno de los ensayos descritos en el presente documento o usando otro ensayo aceptado en la técnica) da como resultado un péptido que no es una parte de la invención.

Los péptidos antioxidantes usados en el método de la presente invención pueden usarse en composiciones farmacéuticas o dietéticas. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse usando procedimientos convencionales en la técnica y pueden diseñarse para cualquier vía de administración. En algunas composiciones farmacéuticas, los péptidos se añadirán con el fin de evitar la destrucción oxidativa de agentes terapéuticos activos y deberían estar presentes en una cantidad suficiente para eliminar eficazmente radicales libres. Por ejemplo, un péptido puede estar presente en composiciones líquidas a entre 0,1 μg/ml y 1,0 mg/ml y, en formas farmacéuticas sólidas, a entre el 0,0001% y el 10% del peso total de la composición.

En otros casos, el propio péptido puede constituir un principio activo primario en composiciones farmacéuticas diseñadas para tratar afecciones patológicas asociados con una oxidación excesiva. En estos casos, un péptido constituirá normalmente un porcentaje mucho más alto de una forma farmacéutica. Por ejemplo, puede constituir el 1-100% de una forma farmacéutica sólida o estar presente en formas farmacéuticas líquidas a una concentración que oscila desde 0,1 mg/ml hasta 10 mg/ml. El péptido puede constituir el único principio activo o combinarse con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, otros antioxidantes. Las afecciones que pueden tratarse usando composiciones farmacéuticas que contienen los péptidos antioxidantes son afecciones hipertensivas, afecciones inflamatorias, afecciones alérgicas y afecciones autoinmunitarias. Ejemplos específicos incluyen artritis, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, cáncer y esclerosis múltiple. El uso de antioxidantes también ha resultado ser recientemente útil en la prevención del daño tisular tras una lesión traumática (por ejemplo, en la columna vertebral), tras un accidente cerebrovascular o tras un ataque al corazón. En general, los pacientes deberían poder tolerar niveles muy altos de antioxidantes (por ejemplo, entre 50 mg y 10 g por día) y las dosificaciones exactas pueden determinarse usando métodos bien establecidos entre los médicos.

Los péptidos de la presente invención también pueden servir como aditivos en composiciones dietéticas de dos formas diferentes. En primer lugar, pueden añadirse a una composición alimenticia con el fin de evitar la oxidación de aceites o grasas. Bajo estas circunstancias, los péptidos pueden estar presentes en un intervalo muy amplio de concentraciones. Por ejemplo, puede constituir desde aproximadamente el 0,0001% hasta aproximadamente el 10,0% del peso total de la composición alimenticia. Ejemplos de aceites y grasas que pueden protegerse usando los péptidos incluyen aceite para freír, aceite vegetal, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de palma, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de semilla de algodón, grasas naturales, mantecas y grasas sintéticas. Éstos y compuestos similares pueden estar presentes en un intervalo muy amplio de productos alimenticios incluyendo carnes, productos lácteos y alimentos elaborados.

Alternativamente, los péptidos pueden estar presentes en un complemento diseñado para mejorar la dieta de una persona. En este caso, el péptido puede constituir un porcentaje mucho más alto del peso total del producto (por ejemplo, desde el 0,01% - 100%) y puede combinarse con otros complementos tales como vitaminas y minerales. Los complementos dietéticos que contienen el péptido pueden diseñarse para su consumo sin receta, en cuyo caso los complementos estarán normalmente en forma de un comprimido, cápsula o disolución. Alternativamente, los complementos pueden diseñarse para la administración en un entorno hospitalario, en cuyo caso pueden estar presentes como parte de una composición líquida para administración parenteral. En general, la gente debe poder tomar de manera segura en cualquier sitio desde 50 mg hasta 10 o más gramos de un complemento peptídico por día.

Los péptidos usados en el método de la presente invención se preparan mediante la digestión de aislado de proteína de soja (disponible comercialmente, por ejemplo, de Protein Technology International, St. Louis, MO, o usando procedimientos bien establecidos en la técnica) con una proteasa para producir una disolución de hidrolizado acuosa. Las proteasas que pueden usarse para la digestión incluyen quimosina, papaína, neutrasa, Promod, y Flavozima y, preferiblemente, o bien alcalasa o bien corolasa. La proteasa puede proceder de fuentes fúngicas, vegetales o bacterianas. La disolución de hidrolizado acuosa se extrae con un disolvente orgánico, preferiblemente acetona, y la fase orgánica se selecciona para tratamiento adicional. Tras la extracción, el disolvente puede eliminarse a presión reducida para concentrar el péptido y la preparación se fracciona entonces mediante cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) en fase inversa. Las fracciones recogidas durante este procedimiento pueden someterse a ensayo para determinar la

actividad antioxidante usando métodos tales como los descritos en la sección de ejemplos en el presente documento. La identificación de fracciones que contienen el péptido puede basarse en la presencia de actividad antioxidante y en el tiempo de retención durante la cromatografía. La identidad del péptido dentro de las fracciones puede confirmarse mediante el análisis de secuencias.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: la figura 1 es una representación esquemática que muestra un método para el tratamiento de proteína de soja, por ejemplo aislado de proteína de soja, para purificar parcialmente proteínas antioxidantes. La disolución y el precipitante finales mostrados en la figura se tratan adicionalmente mediante HPLC en fase inversa.

Figura 2: Espectro de HPLC en fase inversa de los péptidos antioxidantes aislados a partir de hidrolizado de proteína de soja. La proteína de soja, por ejemplo aislado de proteína de soja, se digirió con o bien alcalasa o bien corolasa y se trató tal como se describe en la sección de ejemplos. La etapa final en la purificación implica HPLC en fase inversa y un cromatograma obtenido a partir de esta etapa se muestra en la figura 2. Los diversos picos mostrados en la figura son tal como sigue: P5: GVAWW (SEQ ID NO:2); P5S: FWWPF (SEC ID NO:6); P6: GVAWWM (SEC ID NO:3); P6O: GVAWWM*; P7: GVAWWMY (SEC ID NO:4) y P7O: GVAWWM*Y.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en la identificación de péptidos antioxidantes producidos mediante la hidrólisis enzimática de proteína de soja. Se encontró que varios de los péptidos eran fragmentos de subunidades G1, G2 y G3 de glicinina, la proteína de soja más abundante. El análisis espectroscópico de los péptidos purificados indicó que sus pesos eran 431, 617, 748, 764, 911 y 927 Daltons. Experimentos de secuenciación revelaron secuencias de: GVAW (SEQ ID NO:1); GVAWW (SEQ ID NO:2); GVAWWM (SEQ ID NO:3); GVAWWM*; GVAWWMY (SEQ ID NO:4) y GVAWWM*Y. Los péptidos derivados de soja adicionales que se encontró que tenían actividad antioxidante que se mencionan en el presente documento sólo a modo de ejemplo y no caen dentro del alcance de la reivindicación fueron: WWMY(SEQ ID NO:5); SWWPF (SEQ ID NO: 6) y WTY.

Preferiblemente, los péptidos antioxidantes se producen a partir de aislado de proteína de soja usando los procedimientos descritos a continuación en la sección de ejemplos. Sin embargo, también pueden usarse procedimientos alternativos. Por ejemplo, los péptidos pueden sintetizarse químicamente usando procedimientos en fase líquida o sólida que son rutinarios en la técnica (véanse por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:7129(1963); Meienhofer, *y cols*., J. Pept. Prot. Res. 13:35(1979); y Fields *y cols*. Pept. Res. 4 95(1991)). Alternativamente, los péptidos pueden producirse de manera recombinante construyendo una secuencia de ácido nucleico que codifica para el péptido, incorporando esto en un vector de expresión en el que la secuencia codificante se sitúa bajo el control de un promotor, transformando una célula huésped apropiada con el vector y entonces incubando la célula huésped transformada en las condiciones mediante las que se sintetiza el péptido. El péptido puede purificarse o bien a partir de la célula huésped o bien a partir del medio en el que se hace crecer la célula.

Los péptidos antioxidantes pueden usarse en composiciones cosméticas, farmacéuticas o dietéticas. En cada caso, el péptido pueden estar presente en una cantidad relativamente baja (por ejemplo el 0,0001% - 10% del peso total de la composición y preferiblemente desde el 0,001% hasta el 1%) con el fin de eliminar radicales libres y evitar que otros compuestos experimenten degradación oxidativa. Alternativamente, el propio péptido puede ser un principio activo para el tratamiento de una enfermedad o afección asociadas con oxidación excesiva o puede servir como un complemento dietético. En estos casos, el péptido puede constituir desde el 0,01% hasta el 100% de una composición sólida o estar presente en una composición líquida a entre 0,1 mg/ml y 10 mg/ml.

Como agentes farmacéuticos, los péptidos antioxidantes son compatibles con cualquier forma farmacéutica o vía de administración. Específicamente, los péptidos pueden administrarse por vía intranasal, por vía parenteral o por vía transdérmica. Las formas farmacéuticas pueden incluir comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos, pastillas para chupar, formulaciones parenterales, líquidos, polvos y formulaciones diseñadas para la implantación o administración en la superficie de la piel. Se espera que las formas farmacéuticas orales sean las más convenientes en la mayoría de los casos pero las formulaciones parenterales también pueden ser útiles en un entorno hospitalario. Por ejemplo, los péptidos pueden incluirse como parte de un goteo intravenoso administrado a un paciente tras una lesión traumática, accidente cerebrovascular o ataque al corazón. Todas las formas farmacéuticas pueden prepararse usando métodos que son convencionales en la técnica (véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., A. Oslo ed., Easton, PA(1980)).

Pueden usarse péptidos activos junto con cualquiera de los vehículos y excipientes comúnmente empleados en composiciones farmacéuticas, por ejemplo, talco, goma arábiga, lactosa, almidón, estearato de magnesio, manteca de cacao, disolventes acuosos o no acuosos, aceites, derivados de parafina, glicoles, etc. Los agentes colorantes y aromatizantes también pueden añadirse a preparaciones diseñadas para administración oral. Las disoluciones pueden prepararse usando agua o disolventes orgánicos fisiológicamente compatibles tales como etanol, 1,2-propilenglicol, poliglicoles, dimetilsulfóxido, alcoholes grasos, triglicéridos, ésteres parciales de glicerina y similares. Las composiciones parenterales que contienen péptidos pueden prepararse usando técnicas convencionales e incluyen solución salina isotónica estéril, agua, 1,3-butanodiol, etanol, 1,2-propilenglicol, poliglicoles mezclados con agua, solución Ringer, etc.

La dosificación diaria administrada a un paciente puede proporcionarse en un régimen o bien único o bien múltiple dependiendo de una variedad de circunstancias clínicas. Las dosificaciones óptimas se determinarán mediante métodos bien conocidos en la técnica y estarán influenciadas por factores clínicos tales como la edad y la afección del paciente y la enfermedad o el trastorno que esté tratándose. En general, se espera que un intervalo de dosificación adecuado para la administración intravenosa esté entre 10 y 500 microgramos de péptido por kilogramo de peso corporal del paciente. Cuando se administran por vía oral, las dosificaciones normalmente serán significativamente más altas y estarán, normalmente, en un intervalo de entre 50 mg por día y 10 gramos por día. Cuando se usa como parte de un complemento dietético, el péptido se administrará normalmente por vía oral en forma de un comprimido, cápsula o líquido. Los péptidos pueden combinarse con otros complementos dietéticos tales como vitaminas y minerales.

Los péptidos antioxidantes usados en el método de la presente invención pueden producirse a partir de proteína de soja, preferiblemente aislado de proteína de soja. La primera etapa de este procedimiento implica digerir la proteína de soja con una proteasa en condiciones suficientes para dar como resultado la generación del péptido. Aunque pueden usarse muchas proteasas diferentes, se ha encontrado que la alcalasa y corolasa son particularmente eficaces. Las condiciones exactas para la digestión pueden variar en un amplio intervalo pero en una realización preferida, la digestión se lleva a cabo a 50ºC durante un período de aproximadamente tres horas. Tras la inactivación de la enzima, la mezcla de digestión se extrae con disolvente orgánico. Por ejemplo, la extracción puede tener lugar usando aproximadamente un volumen igual de acetona. El sobrenadante de la extracción, es decir, la fase orgánica se recupera y el disolvente se elimina a presión reducida.

Tras recuperar el péptido de la extracción, puede llevarse a cabo la cromatografía de líquidos a alta presión en fase inversa usando, por ejemplo, una columna C18. Pueden usarse una variedad de sistemas de disolvente para eluir la columna pero se ha encontrado que un gradiente desde el 5-60% de acetonitrilo en tampón fosfato a pH 6,8 es eficaz. Pueden someterse a prueba las fracciones recogidas de la columna para determinar la actividad antioxidante para identificar picos que son de interés. Finalmente, los péptidos específicos pueden identificarse llevando a cabo experimentos de secuenciación.

Ejemplos

A. *Actividad antioxidante recuperada tras el tratamiento con enzima*

Se incubaron tres frascos de vidrio de fondo plano que contenían 100 ml de aislado de proteína de soja PTI XT 34 al 5% en un baño de agua a 50ºC con 0,4 ml de alcalasa. Se detuvo la incubación a 1 hora, 2 horas y 4 horas poniendo el frasco en un baño de agua a 80-85ºC durante diez minutos. Se obtuvieron preparaciones control inactivando en primer lugar la enzima alcalasa a 80-85ºC durante al menos 10 minutos y entonces añadiendo la preparación de enzima inactivada a 100 ml de una disolución de SPI al 5%. Tras la centrifugación en una microcentrífuga Eppendorf, se diluyeron los sobrenadantes 5 veces. Se midieron los grupos amino libres como equivalentes de leucina como una estimación del péptido liberado durante la hidrólisis y se diluyeron las composiciones 10 veces y se usaron para llevar a cabo ensayos de radical ABTS (descritos más ampliamente a continuación). Los resultados indicaron que la actividad antioxidante aumentó a medida que avanzaba la hidrólisis y se liberaban los péptidos.

B. *Selección de hidrólisis de proteína de soja mediante diferentes enzimas*

Se preparó una suspensión de proteína de soja sólida total al 14% mezclando 700 g de aislado de proteína de soja (SuproXT34) con 4300 g de agua caliente (aproximadamente 60ºC). Se prepararon alícuotas con 750 g de la suspensión resultante y se incubaron con enzima en las condiciones mostradas en la tabla 1.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Muestra	Enzima	Condiciones de reacción
1.	N-22 (1 ml)/quimosina (1 ml)	45°C 220 min.
2.	N-22 (1 ml)/papaína (1 ml)	50°C 220 min.
3.	N-22 (1 ml)/Corolasa (1 ml)	50°C 220 min.
4.	446 (1 ml)/quimosina (1 ml)	45°C 220 min.
5.	446 (1 ml)/papaína (1 ml)	50°C 200 min.
6.	446 (1 ml)/Corolasa (1 ml)	50°C 200 min.
7.	Alcalasa (1 ml)	50°C 240 min.
8.	Neutrasa (1 ml)	50°C 240 min.
9.	Promod 24L (1 ml)	50°C 220 min.
10.	Flavozima (1 ml)	50°C 220 min.

- N-22: Proteasa NS 37022 (Novo Nordisk);
- Alcalasa (Novo Nordisk);
- 446: Glutamil-endopeptidasa (SP 446) (Novo Nordisk);
- Corolasa PN-L (Creanova Inc);
- Papaína 6000 (Valley Research Inc, Hammond IN);
- Promod 24L (Biocatalysts Ltd., Mid Glamorgan, RU);
- Flavozima (Novo Nordisk);
- Neutrasa: Proteasa bacteriana neutra (Medipharm AB, Kagerod Suecia).

Se añadió un volumen de acetona para precipitar polipéptidos grandes y/o proteínas intactas no hidrolizadas. Se separó el residuo mediante centrifugación y se lavó con aproximadamente un volumen de acetona al 50%. Entonces se eliminó el disolvente orgánico usando un evaporador rotatorio a 40-60ºC. La muestra en esta etapa se denominó como SP1-10. Entonces se añadió la mitad del peso de SP1-10 de sulfato de amonio a los péptidos hidrófobos y se centrifugó la mezcla. La fase I, que contenía acetona era la fase "aceitosa" superior, y la fase II era la fase acuosa inferior. Se extrajo adicionalmente la acuosa fase con acetona y se combinó con la fase I. Se concentró el extracto y se denominó como SE1-10. Entonces se determinó la concentración de los péptidos del hidrolizado de proteínas por parejas (SP con SE).

Se determinó la concentración de los péptidos en muestras mediante el método del ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) usando leucina como patrón (Adler-Nissen, J. Agric. Food Chem. 27: 1256 (1979)). Se combinaron volúmenes iguales de muestra en tampón fosfato aproximadamente 0,2 M, pH 8,2 y una disolución de TNB al 0,1% y se incubaron a 50ºC durante una hora. Se añadió un volumen de HCl 0,1 N igual al volumen total de la muestra combinada y disolución de TNB para detener la reacción. Entonces se enfrió la muestra hasta temperatura ambiente. Se realizó una lectura de la absorbancia a 415 nm tras 30 minutos.

La tabla 2 muestra la concentración de los péptidos en las muestras preparadas usando diferentes proteasas. Los niveles de péptido cambian debido a diferencias en especificidades de enzima, actividades, perfiles de producto y condiciones de reacción. A continuación se muestran los resultados para SP y SE porque estas muestras eran particularmente ricas en actividad antioxidante de péptido. También se resume en la tabla 2 la actividad antioxidante de las muestras evaluadas mediante un ensayo de radical ABTS.

TABLA 2

Muestra	Equivalente de leucina (mM) SP	Equivalente de leucina (mM) SE	Equivalente de Trolox SP	Equivalente de Trolox SE
1	32,9	54	0,46	0,40
2	55	95	0,37	0,54
3	78,9	110	0,39	0,61
4	40,5	69	0,56	0,50
5	69,4	109	0,40	0,56
6	99,3	109	0,48	0,57
7	132	135	0,56	0,60
8	73,9	136	0,42	0,58
9	63,8	137	0,38	0,57
10	96,4	146	0,41	0,51

C. *Hidrólisis de la proteína de soja y extracción del péptido*

El procedimiento para hidrolizar proteína de soja y extraer el péptido se muestra esquemáticamente en la figura 1. El procedimiento se realiza tal como sigue:

1. Se mezclan 18 g de aislado de proteína de soja con 162 ml de agua para obtener una mezcla al 10%.

2. Se añade 1 ml de enzima y se incuba la preparación en un baño de agua a 50ºC durante tres horas.

3. Se inactiva la enzima a 80-85ºC durante diez minutos.

4. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se mezclan 160 ml de la mezcla tratada con 106 ml de acetona.

5. Se centrifuga la preparación a 15.000-22.000 g durante treinta minutos para obtener el sobrenadante.

6. Se mezcla el sedimento de la etapa de centrifugación con 200 ml de acetona al 50%.

7. Se repite la centrifugación y se combinan los sobrenadantes. Si aparece un precipitado, se centrifuga la preparación además se recupera el sobrenadante.

8. Se elimina la acetona a presión reducida bajo un evaporador rotatorio.

9. Si aparece un precipitado, se centrifuga la preparación.

10. Se disuelve la mitad de la cantidad en peso de sulfato de amonio en el sobrenadante.

11. Se extrae la disolución con 1/3-1/2 volúmenes de acetona de dos a tres veces.

12. Se concentra la fase orgánica y entonces se almacena la muestra en un refrigerador antes del análisis. Si se forma un precipitado durante el almacenado, tanto el sobrenadante como el precipitante se usan para el aislamiento del péptido antioxidante.

D. *Aislamiento del péptido mediante PLC*

Muestras

1. Aislado de proteína de soja (ADM-891 tratado con alcalasa)

2. Aislado de proteína de soja (ADM-891 tratado con corolasa-PNL)

Sobrenadante

Con el fin de preparar muestras para HPLC, se seca el sobrenadante mediante flujo de nitrógeno y se mezcla el residuo con la fase móvil A (acetonitrilo (ACN) al 5% en tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 6,8) y se centrifuga para eliminar el material no disuelto antes del análisis y aislamiento. Se inyecta la muestra preparada en un sistema de HPLC.

Se lleva a cabo la HPLC en fase inversa usando una columna Lachrom Purospher RP-18, una bomba Hitachi L-7100, un inyector automático L-7200, un detector de red de diodos L-7455 y un software de administración de sistemas para HPLC D-7000 (Hitachi, Instruments, Inc. San José, CA). Se usan dos fases móviles (eluyentes) en la separación HPLC:

A: 5% de ACN en tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 6,8;

B: 60% de ACN, 40% de tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 6,8.

Se fija la velocidad de flujo de columnas a 0,6 ml/min. y se fija la absorbancia ultravioleta a 275 nm. Se fija el programa de elución en gradiente tal como sigue:

0-2 min., el 90% de fase móvil A/el 10% de fase móvil B;

2-40 min., desde el 90% de fase móvil A/el 10% de fase móvil B hasta el 100% de fase móvil B.

Se recogen las fracciones con actividad antioxidante y se someten a purificación adicional. Esto se lleva a cabo usando las fases móviles:

A: ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%, ACN al 5%

B: TFA al 0,05%, ACN al 80%.

Se fija la velocidad de flujo a 0,6 ml/min., 0,45 ml/min. o 0,4 ml/min. y se fija la absorbancia ultravioleta a 275 nm. Se fija el programa de elución en gradiente tal como sigue:

0-2 min., el 90% de fase móvil A/el 10% de fase móvil B;

2-25 min. desde el 90% de fase móvil A/el 10% de fase móvil B hasta el 60% de fase móvil A/el 40% de fase móvil B;

25-40 min., desde el 60% de fase móvil A/el 40% de fase móvil B hasta el 10% de fase móvil A/el 90% de fase móvil B.

Se recogen las fracciones con actividad antioxidante y se someten a purificación adicional. En este caso, se usan las mismas fases móviles. Se fija la velocidad de flujo a 0,4 ml/min. y se fija la absorbancia ultravioleta a 275 nm. Se fija el programa de elución en gradiente tal como sigue:

0,2 min. el 70% de fase móvil A/el 30% de fase móvil B;

2-40 min., desde el 70% de fase móvil A/el 30% de fase móvil B hasta el 100% de fase móvil B.

Precipitante

Se disuelve el precipitante de la muestra anterior o la muestra seca por soplado con nitrógeno en una disolución de acetonitrilo al 80%, ácido trifluoroacético al 0,05%. Se usa el mismo sistema de HPLC básico. Las fases móviles son:

A: TFA al 0,1%, ACN al 5%

B: TFA al 0,05%, ACN al 80%

Se fija la velocidad de flujo a 0,6 ml/min. y se fija la absorbancia ultravioleta a 275 nm. Se fija el programa de elución en gradiente tal como sigue:

0-2 min., el 90% de fase móvil A/el 10% de fase móvil B

2-25 min. desde el 90% de fase móvil A/el 10% de fase móvil B hasta el 60% de fase móvil A/el 40% de fase móvil B.

25-40 min. desde el 60% de fase móvil A/el 40% de fase móvil B hasta el 10% de fase móvil A/el 90% de fase móvil B.

Se muestra un cromatograma típico como figura 2.

E. *Determinación de la secuencia de péptidos*

Se determinaron mediante HPLC-EM las secuencias de péptidos aislados mediante HPLC. Se seleccionaron composiciones de fase móvil en gradiente que contenían TFA al 0,05% en agua y TFA al 0,05% en acetonitrilo para la separación de péptidos usando una HPLC Waters Alliance 2690 (Waters Corporation Milford, MA). Se separaron los péptidos usando una columna Symmetry C-18 de 2,1 x 150 mm, tamaño de partícula 3,5 μm de fase inversa (Waters Corporation Milford, MA) mantenida a 40ºC. La velocidad de flujo era de 200 μl/min. lo que se dividió a 80:120 entre el detector de absorbancia de longitud de onda UV dual Waters 2487 y el espectrómetro de masas Finnegan MAT TSQ 700 (ThermoQuest, San José, CA). Se fijó el detector de absorbancia de longitud de onda UV dual Waters 2487 para obtener datos UV a 214 y 280 nm. Se llevaron a cabo análisis de masa de péptido en el TSQ700 utilizando la interfaz de fuente de iones Finnigan API 1 en el modo de ionización por electrospray positivo con un capilar calentado a una temperatura de 260ºC. Se usó un método HPLC/EMEM automatizado en dependencia del tiempo de retención para obtener el espectro de masas tándem producto-ion usando un programa informático añadido a la línea de control instrumental (ICL) de TSQ700. Se obtuvieron todos los espectros de masas tándem con la célula de colisión llena de argón a una presión de entre 2 y 3,5 mTorr y energías de colisión entre -10 y -44 eV. Se analizaron de nuevo los datos de espectroscopia de masas tándem usando el programa informático SEQUEST (autorizado por Therma Quest y operado en una estación de trabajo Xcalibur Windows NT 4.0) para identificar secuencias de péptidos en una base de datos de soja descargada bajo "glicina" para *Glycine max* del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*). Se muestran las secuencias en la tabla 3. Aquellas secuencias no usadas en el método de la presente invención se incluyen sólo para fines a modo de ejemplo.

TABLA 3

Secuencia determinada	SEQ ID NO	Peso mol.	Fuente
GVAW	SEQ ID NO:1	431	11s: Subunidad G1, G2 y G3
GVAWW	SEQ ID NO:2	617	11s: Subunidad G1, G2 y G3
GVAWWM	SEQ ID NO:3	748	11s: Subunidad G1, G2 y G3
GVAWWM*	-	764	11s: Subunidad G1, G2 y G3
GVAWWMY	SEQ ID NO:4	911	11s: Subunidad G1, G2 y G3
GVAWWM*Y	-	927	11s: Subunidad G1, G2 y G3
WWMY	SEQ ID NO:5	684	11s: Subunidad G1, G2 y G3
SWWPF	SEQ ID NO:6	721	Proteína de unión a sacarosa
WTY	-	468	11S: G4, G5, polipéptido II de la citocromo C oxidasa

F. *Pueden sintetizarse péptidos de la invención*

Los expertos en la técnica de la química del amino, química alimenticia, química de las proteínas y/o de la inmunología conocen bien los métodos para sintetizar péptidos. Por ejemplo, se sintetizan los péptidos usando química Fmoc en fase sólida según los principios inicialmente descritos por Merrifield (J. Am. Chem. Soc. 85; 7129 (1963)) tal como se modificaron posteriormente por Meienhofer *y cols*. (J. Peptide Prot. Res. 13; 35 (1979)) y Fields, *y cols*., Peptide Res. 4; 95 (1991)). Normalmente, se lleva a cabo tal síntesis en sintetizadores de péptidos automatizados, tales como los disponibles de Applied Biosystems (Foster City, CA). Una vez sintetizadas, normalmente se verifican las secuencias usando un secuenciador de péptidos automatizado tal como un Porton modelo 2090 (Beckman Instruments Inc., Mountain View, CA).

G. *Métodos de ensayo de antioxidante*

Ensayo de radical ABTS

Este ensayo mide el poder de reducción total de péptidos con respecto a un radical ABTS formado previamente según los métodos de Pellegrini, *y cols*. (Meth. Enzymol. 299:379 1999)). En el ensayo, se combinan 0,175 ml de tampón fosfato 20 mM (PB, pH 6,8) y 1,0 ml de disolución de radical ABTS (0,837 en A734 nm) en un tubo Ep. Se añaden 0,025 ml de muestra a la disolución. Se agita la mezcla y se mide la absorbancia a 734 nm tras diez minutos. Se usa el disolvente de la muestra como blanco si es apropiado. Se prepara la disolución de trabajo de radical ABTS añadiendo un volumen de una disolución madre de radical ABTS a 80 volúmenes de PB 20 mM (pH 6,8) y añadiendo, si es necesario, disolución madre de PB o ABTS para ajustar la absorbancia hasta aproximadamente de 0,83 a 734 nm. La disolución madre de radical ABTS contiene $K_2S_2O_8$ 2,5 mM y ABTS 6,9 mM.

Extinción de radicales alquilperoxilo

Pueden llevarse a cabo análisis para determinar la actividad antioxidante de los péptidos midiendo la extinción de radicales alquilperoxilo. Se usó un ensayo de peróxido de t-butoxilo/beta-caroteno basándose en varios ensayos publicados (Akaike, *y cols*., J. Agric. Food Chem. 43:1864 (1995); Nakao *y cols*., Phytochem.49:2379 (1998); Burton *y cols*., Science 224:569 (1984)). Este ensayo implica dos reacciones consecutivas:

(i) t-BuOOH + MetMb ? ≡t-BuOO·

(ii) t-BuOO· + beta-caroteno ? blanqueo

La reacción del radical peroxilo con beta-caroteno da como resultado la desaparición del color amarillo asociado con el beta-caroteno (es decir, blanqueo). La absorbancia medida a 452 nm indica que los antioxidantes compiten eficazmente por el radical peroxilo e impiden el blanqueo. Los resultados de esta prueba indican la capacidad relativa de extinción del radical alquilperoxilo de los péptidos en comparación con el beta-caroteno.

Se lleva a cabo el ensayo combinando 725 ml de tampón fosfato 20 mM (PB, pH 7,4) con 120 μl de Tween 20 (2,4%) y 120 μl de MetMb (MetMb 50 μM preparado mezclando 1:1 v/v de mioglobina 100 μM (Sigma, St. Louis, MO) y ferricianuro de potasio 100 μM (Aldrich, Milwaukee, WI) en PB). Se incuba la mezcla a 37ºC. Se añade beta-caroteno (disolución saturada en acetona a 37ºC) y se mezcla la disolución. Entonces, se añaden 25 μl de péptidos o patrón de Trolox (de 0,5 a 10 mM) y 150 μl de t-BuOOH 50 mM en PB. Se mezcla la muestra y se lee la absorbancia a 452 nM a 30 s. y entonces a intervalos de un minuto durante aproximadamente 10 ó 12 minutos. Se usa acetonitrilo al 50% como blanco si es apropiado.

Ensayo FOX de oxidación de ácido linoleico

El ácido graso insaturado es propenso a la oxidación. Esto puede deberse a la oxidación directa mediante oxígeno molecular o facilitarse mediante iones de metales de transición u otros radicales. Los productos oxidados iniciales son peróxidos. Se desarrolló este ensayo para evaluar la actividad de los antioxidantes, incluyendo péptidos, en la prevención de la oxidación de ácido linoleico. Se mide la concentración de peróxidos generados según los métodos de Jiang, *y cols*. (Analyt. Biochem. 202:384 (1992)) y Lowum, *y cols*. (J Food Biochem. 13:391 (1989)). Se preparan curvas patrón usando peróxido de hidrógeno a una serie de concentraciones conocidas. Se lleva a cabo el ensayo tal como sigue:

1. Emulsión: preparar dos 120 μl de Tween 20, 1 ml de ácido linoleico de PB (20 mM, pH 7,4) o tampón ácido cítrico-fosfato (Na_2HPO_4 0,2125 M mezclado con ácido cítrico 0,1 a pH 4,1 y diluido de 30 ml a 200 ml) hasta un total de 32 ml en tubos de centrifugado tapados de 50 ml; agitar con vórtex aproximadamente cinco minutos hasta formar una emulsión blanca, similar a leche y mezclar las dos para tener la misma emulsión por triplicado de seis o siete muestras.

2. Muestra: 1,6 ml de dH_2O y 0,4 ml de ACN al 50% como control o muestra 2,5 mM o 5 mM en ACN al 50% en tubos de centrifugado tapados de 12 ml.

3. Tomar 8 ml de emulsión y mezclar con los 2 ml de control o muestra en el tubo de centrifugado tapado de 12 ml; agitar con vórtex dos minutos; tomar 3 ml en un vial de centelleo abierto de 20 ml con un agitador; preparar triplicados de cada muestra. Se usa el resto (aproximadamente 1 ml) para el momento cero de cada muestra y se mezcla con reactivo FOX como la etapa 5.

4. Incubar y agitar a 37ºC al aire libre.

5. En momentos determinados (normalmente intervalos de 30 minutos), preparar alícuotas con 50 μl de la emulsión de reacción y mezclar con 950 μl de reactivo FOX en un tubo Ep y agitar con vórtex.

6. Dejar reposar durante más de 30 minutos (40 minutos-1 hora), realizar una lectura a A560 nm (dH_2O como blanco).

Se prepara el reactivo FOX combinando 900 ml de MeOH, 100 ml de H_2SO_4 250 mM, 880 mg de BHT, 76 mg de naranja de xilenol y 98 mg de sulfato de amonio hexahidratado. Se prepara una curva patrón diluyendo peróxido de hidrógeno hasta obtener concentraciones de 25, 50, 100, 250, 500, 600, 800 y 1000 μM con tampón apropiado y se mezclan 50 μl de disolución con 950 μl reactivo FOX. Se toman las lecturas a 1 hora a A560 nm. La concentración de Trolox final en la reacción es 0,1 mM. La concentración final de las muestras (genisteína o péptidos) es 0,2 mM.

Extinción de ion superóxido

Se lleva a cabo este análisis para evaluar la capacidad de los péptidos para extinguir el ion superóxido. Se lleva a cabo el ensayo de ion superóxido según los métodos de Yen, *y cols*. (J. Agric. Food Chem. 43:27 (1995) y Nishikimi, *y cols*. (Biochem. Biophys. Res. Comm. 46:849 (1972)). Para este ensayo, se combinan 830 μl de PB (0,1 M, pH 7,4), 120 μl de metosulfato de fenacina (PMS) 0,15 mM en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4, 120 μl de azul de nitro-tetrazolio (NBT) 0,375 mM en tampón fosfato y 50 μl de muestra o disolvente de la muestra en un tubo Ep. A esta disolución se le añaden 100 μl de disolución NADH 2,34 mM para hacer empezar la reacción. Se agita la disolución y se realiza una lectura de la absorbancia a 560 nm tras cinco minutos. Se usa el disolvente de la muestra como control.

REIVINDICACIONES

1. Método de reducción de la degradación oxidativa de grasas o aceites en una composición, que comprende añadir a dicha composición una cantidad eficaz de una proteína aislada que consiste en cualquiera de las siguientes secuencias:

GVAW;

GVAWW;

GVAWWM;

GVAWWMY;

GVAWWM*; y

GVAWWM*Y, en las que M* es sulfóxido de metionina.

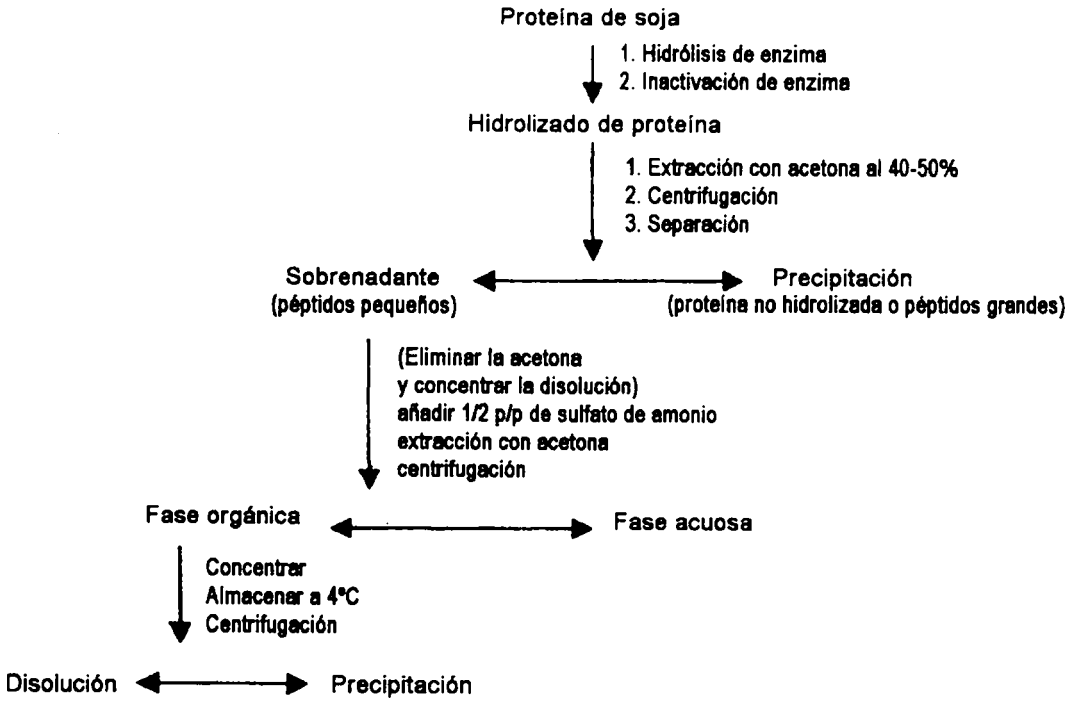
Proteína de soja
1. Hidrólisis de enzima
2. Inactivación de enzima
Hidrolizado de proteína
1. Extracción con acetona al 40-50%
2. Centrifugación
3. Separación
Sobrenadante
(péptidos pequeños)
Precipitación
(proteína no hidrolizada o péptidos grandes)
(Eliminar la acetona
y concentrar la disolución)
añadir 1/2 p/p de sulfato de amonio
extracción con acetona
centrifugación
Fase orgánica
Fase acuosa
Concentrar
Almacenar a 4°C
Centrifugación
Disolución
Precipitación

Figura 1

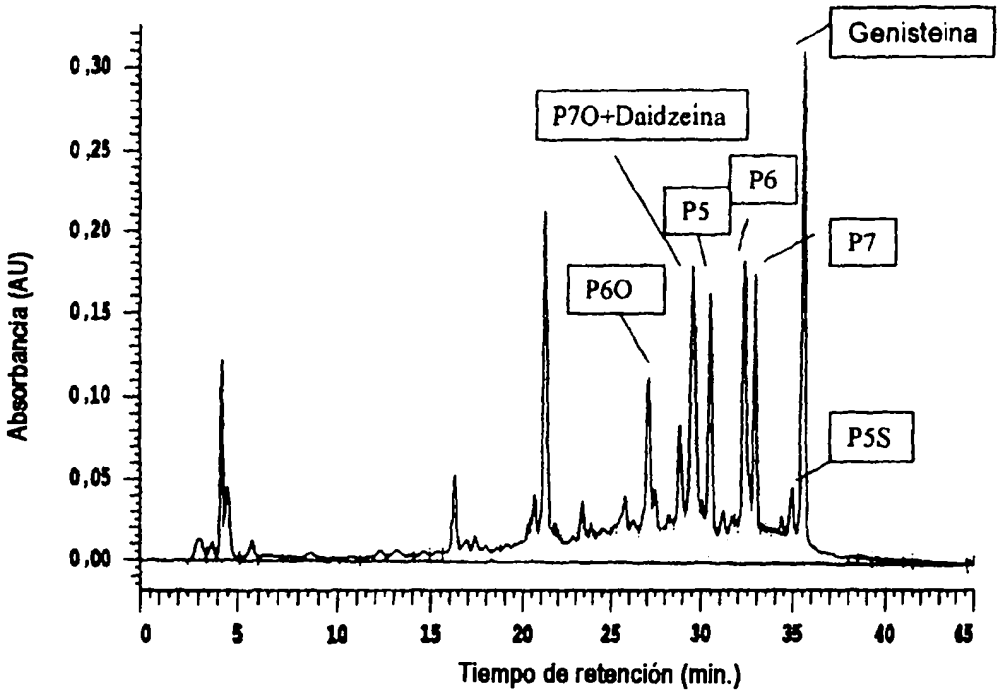
Genisteina
P7O+Daidzeina
P6
P5
P7
P6O
P5S
Absorbancia (AU)
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Tiempo de retención (min.)

Figura 2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Kraft Foods Holdings, Inc

<120> Antioxidantes peptídicos a partir de proteína de soja

<130> P504815EP

<140> todavía no conocido
<141> 04/05/2004

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: *Glycine max*

<400> 1

Gly Val Ala Trp
1

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: *Glycine max*

<400> 2

Gly Val Ala Trp Trp
1 5

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: *Glycine max*

<400> 3

Gly Val Ala Trp Trp Met
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: *Glycine max*

<400> 4

Gly Val Ala Trp Trp Met Tyr
1 5

<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: *Glycine max*

<400> 5

Trp Trp Met Tyr
1

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: *Glycine max*

<400> 6

Ser Trp Trp Pro Phe
1 5