(11) Número de Publicação: **PT 1302207 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 38/05 (2006.01) ***C12P 21/06*** (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1997.08.01**

(30) Prioridade(s): **1996.08.02 JP 20466596**

(43) Data de publicação do pedido: **2003.04.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.10.03**
117/2007

(73) Titular(es):
CALPIS CO., LTD.
4-1, EBISU-MINAMI 2-CHOME SHIBUYA-KU, TOKYO 150-0022 **JP**

(72) Inventor(es):
NAOYUKI YAMAMOTO **JP**

(74) Mandatário:
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM AGENTE ANTI-HIPERTENSOR CONTENDO UM DIPÉPTIDO COMO COMPONETE ACTIVO**

(57) Resumo:

RESUMO

"Processo para a preparação de um agente anti-hipertensor contendo um dipéptido como componente activo"

Um processo para produzir um agente anti-hipertensor contendo uma quantidade eficaz de dipéptido Tyr-Pro e/ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, sendo a quantidade eficaz de 0,05 a 10 mg/kg de massa corporal/dia.

DESCRIÇÃO

"Processo para a preparação de um agente anti-hipertensor contendo um dipéptido como componente activo"

O presente invento refere-se a um processo para preparar um agente anti-hipertensor que contém, como componente activo, um dipéptido possuindo efeito anti-hipertensor, agente esse que pode ser utilizado em medicina, alimentos para utilização específica na saúde e alimentos saudáveis, e agente esse que exibe o efeito mesmo numa dose pequena.

A enzima conversora de angiotensina (ACE), que tem uma relação próxima com a manifestação de hipertensão, existe principalmente nos pulmões ou em células angioendoteliais. Sabe-se que a ACE exibe um forte efeito hipertensor ao clivar angiotensina I produzida por renina, para produzir angiotensina II, um péptido bioactivo que provoca a contracção de um músculo liso de um vaso sanguíneo. Adicionalmente, a ACE degrada e torna inactiva a bradiquinina que possui efeito anti-hipertensor. Consequentemente, a ACE tem um efeito hipertensor, e assim crê-se que a pressão sanguínea possa ser suprimida inibindo a actividade desta enzima.

Entre vários produtos naturais ou produtos sintéticos encontraram-se substâncias com capacidade para inibir a ACE. Algumas dessas substâncias foram já usadas em utilização prática como agente anti-hipertensor. Por exemplo, captopril (D-2-metil-3-mercaptopropanoil-L-prolina) é um produto químico sintético bastante conhecido que possui capacidade de inibir a ACE. No entanto, deve prestar-se especial atenção todas as vezes aos aspectos de segurança desses produtos químicos sintéticos.

Como produtos naturais, foi referido que estão contidos vários péptidos anti-ACE em proteína de leite, proteína de soja ou proteína de carne de peixe. Essas substâncias naturais inibidoras de ACE são propostas para utilização prática como agentes anti-hipertensores possuidores de baixa toxicidade e grande segurança. No entanto, a maioria desses péptidos anti-hipertensores estão contidos apenas em pequenas

quantidades nesses produtos naturais e, portanto, não se pode esperar um efeito suficiente em toma oral prática. Também a maioria dos péptidos não possui forte efeito anti-hipertensor, mesmo se os péptidos possuírem forte actividade de inibição de ACE.

Recentemente, publicou-se um relatório sobre dois tripéptidos que possuem forte actividade inibidora de ACE, Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro, derivados de leite fermentado por bactérias de ácido láctico (*J. Dairy Sci.* 78:777-783). Além disso, foi confirmado o forte efeito anti-hipertensor desses tripéptidos em ratinhos espontaneamente hipertensos (SHR) (*J. Dairy Sci.* 78:1253-1257). No entanto, dado que os tripéptidos são produzidos pela proteinase que é produzida por bactérias do ácido láctico à medida que a fermentação do ácido láctico prossegue no leite, a quantidade de tripéptidos resultante tende a variar em função das condições de fermentação. É portanto difícil obter os tripéptidos numa quantidade estável.

Foi também referido que o iogurte produzido pela fermentação de leite por bactérias de ácido láctico como matéria-prima possui efeito anti-hipertensor (Pedido de Patente Japonesa disponível ao público N.º 95-123977). Contudo, a substância activa para o efeito anti-hipertensor é ainda desconhecida.

Yamamoto (1997) *Biopolymers* 43(2), 129-34 revê vários péptidos inibidores da enzima que converte angiotensina I derivados de materiais alimentares e a hidrólise enzimática de proteínas. Em particular, são considerados os péptidos derivados de caseína láctea pela acção do sistema proteolítico de bactérias de ácido láctico. Diz-se que esses péptidos exibem efeitos anti-hipertensores em ratinhos espontaneamente hipertensos.

Yamamoto *et al.* (1994) *J. Dairy Sci.* 77(4),917-22 divulga leite fermentado com *Lactobacillus helveticus* que se diz mostrar actividade anti-hipertensora em ratinhos espontaneamente hipertensos. Em contraste, o leite fermentado com uma variante de *L. helveticus* fraca em actividade de proteinase não é referido como possuindo esta actividade. Os autores concluem que os péptidos libertados da caseína pela

proteinase no meio de cultura possuem os efeitos anti-hipertensores em ratinhos espontaneamente hipertensos.

Em EP 0737690A divulga-se um agente anti-hipertensor que contém uma quantidade eficaz de um péptido com uma sequência de aminoácidos Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln e/ou um péptido com uma sequência de aminoácidos Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu. É também apresentado um processo para a preparação desse agente anti-hipertensor por fermentação de um material de partida de leite animal com um microorganismo, por exemplo uma bactéria de ácido láctico do género *Lactobacillus*.

Yamamoto *et al.* (1994) *Biosci. Biotech. Biochem.* 58(4), 776-78, divulga leite fermentado com espécies *Lactobacillus* que se diz mostrar actividade anti-hipertensora em ratinhos espontaneamente hipertensos. Pelo contrário, o leite fermentado por outras espécies de *Lactobacillus* não é referido como possuindo esta actividade.

Em DE 3047596 apresentam-se propriedades farmacológicas do dipéptido Tyr-Pro, especificamente no sistema nervoso central de ratinhos.

Deste modo, deseja-se proporcionar um péptido natural anti-hipertensor, especificado como substância activa, que possa ser produzido de um modo industrialmente estável, seja eficaz numa dose pequena, e tenha maior segurança.

É um objecto do presente invento proporcionar um processo para produzir um agente anti-hipertensor para ser utilizado em medicamentos, alimentos para utilizações específicas na saúde e alimentos saudáveis, que seja de elevada segurança e eficaz em dosagem oral.

É outro objecto do presente invento proporcionar um processo para produzir um agente anti-hipertensor que seja eficaz mesmo numa dosagem oral baixa, por purificação do agente anti-hipertensor mencionado anteriormente.

Em conformidade com o presente invento, proporciona-se um processo para a preparação de um agente anti-hipertensor, compreendendo o agente anti-hipertensor uma quantidade eficaz

de péptidos seleccionados do grupo que consiste num dipéptido Tyr-Pro, um sal farmaceuticamente aceitável do dipéptido Tyr-Pro, e suas misturas, compreendendo o referido processo os passos de: efectuar a cultura de bactérias de ácido láctico do género *Lactobacillus* num meio contendo um péptido e/ou proteína incluindo uma sequência de aminoácidos Tyr-Pro, para obter um líquido de cultura contendo o dipéptido Tyr-Pro; efectuar a centrifugação do referido líquido de cultura contendo o dipéptido Tyr-Pro para obter um sobrenadante; e efectuar a purificação do referido sobrenadante com uma resina de fase inversa por absorção e eluição do dipéptido Tyr-Pro, aumentando assim a concentração do dipéptido.

O agente anti-hipertensor do presente invento contém uma quantidade eficaz de dipéptido Tyr-Pro e/ou um seu sal. O sal pode ser enumerado por um sal farmaceuticamente aceitável, incluindo um sal de ácido inorgânico, tal como cloridrato, sulfato ou fosfato, e um sal de ácido orgânico, tal como citrato, maleato, fumarato, tartarato ou lactato.

O agente anti-hipertensor do presente invento contendo o dipéptido Tyr-Pro e/ou um seu sal como componente activo é produzido efectuando a cultura de bactérias de ácido láctico do género *Lactobacillus*, num meio contendo um péptido e/ou uma proteína que inclui a sequência de aminoácidos Tyr-Pro, obtendo-se assim um líquido de cultura contendo o dipéptido Tyr-Pro. Isto é, o dipéptido Tyr-Pro é obtido por tratamento de cultivo do meio com bactérias de ácido láctico do género *Lactobacillus.*

As bactérias de ácido láctico do género *Lactobacillus* podem incluir, por exemplo, *Lactobacillus helveticus, Lactobacillus delbruekii* subespécie *Bulgaricus,* e *Lactobacillus acidophilus.* Dessas, prefere-se particularmente a *Lactobacillus helveticus.*

O meio não está particularmente limitado desde que o meio contenha um péptido e/ou uma proteína incluindo a sequência de aminoácidos Tyr-Pro, e pode incluir meios derivados de vários materiais alimentares contendo proteínas lácteas animais tais como leite inteiro, leite desnatado, e caseína de um leite animal, e materiais alimentares contendo

proteínas vegetais tais como milho, proteína do milho, trigo, proteína de trigo, soja, proteína de soja e soja deslipidada; e meios comercialmente disponíveis para bactérias de ácido láctico tal como caldo de fígado de Briggs e caldo MRS. Além disso, o meio pode ser também uma solução aquosa contendo materiais alimentares naturais contendo proteínas lácteas animais e/ou proteínas vegetais incluindo a sequência de aminoácidos Tyr-Pro, aos quais foram opcionalmente adicionados outros meios para bactérias de ácido láctico, um extracto de levedura, vitaminas ou minerais.

A cultura das bactérias do ácido láctico pode ser efectuada adicionando iniciador de bactérias do ácido láctico de pré-cultura ao meio que foi previamente esterilizado por aquecimento e arrefecimento até à temperatura pré-determinada para incubação. A quantidade de inoculação do iniciador de bactérias do ácido láctico pode ser, de preferência, 10^5 a 10^7 células de bactérias do ácido láctico/ml de meio. A temperatura para a incubação é normalmente 20 a 50°C e de preferência 30 a 45°C. O tempo de incubação é vulgarmente 3 a 48 horas e de preferência 6 a 24 horas. Em particular, prefere-se realizar o cultivo no meio possuindo pH num intervalo de 3,5 a 7, mais preferencialmente 4 a 5, para realizar eficientemente o cultivo de bactérias do ácido láctico. Além disso, prefere-se realizar o cultivo em pH estacionário mantendo o pH num intervalo de 4 a 7. A incubação pode ser terminada, sem restrição, quando o número de bactérias do ácido láctico exceder as 10^8 células/ml.

Além disso, o líquido de cultura contendo o dipéptido Tyr-Pro obtido pelo processo supracitado pode ser centrifugado, e o sobrenadante resultante pode ser submetido a tratamento de purificação com uma resina de fase inversa, para obter um agente anti-hipertensor no qual o teor de componente activo, o dipéptido Tyr-Pro, é maior.

A centrifugação pode ser realizada preferencialmente a por exemplo 5000 a 20000 rpm, durante 1 a 10 minutos. A centrifugação pode ser também efectuada numa centrifugadora.

O tratamento de purificação com uma resina de fase inversa pode ser realizada por absorção e eluição do

dipéptido com uma resina de fase inversa, e/ou por cromatografia de fase inversa, aumentando desse modo a pureza do dipéptido Tyr-Pro. A absorção e eluição com resina de fase inversa podem ser realizadas, por exemplo, tratando o líquido de cultura por um processo de coluna ou um processo descontínuo com uma resina tal como "C18 preparativa" (fabricada por WATERS INC.) como resina de fase inversa, e depois eluindo a fracção absorvida com um solvente polar tal como a água, o metanol, o etanol, o 1-propanol, o 2-propanol ou o acetonitrilo, de preferência uma solução aquosa contendo 20% v/v de acetonitrilo, seguido de evaporação do solvente para concentrar o dipéptido Tyr-Pro.

O tratamento por cromatografia de fase inversa pode ser realizado, sem limitações, pela publicamente conhecida cromatografia líquida de alta eficiência de fase inversa (HPLC). A HPLC pode ser realizada por um processo de gradiente linear usando solventes semelhantes aos enumerados na absorção e eluição com a resina de fase inversa, para obter o dipéptido Tyr-Pro com elevada pureza. O tratamento por cromatografia de fase inversa pode ser repetido muitas vezes para aumentar ainda a pureza do dipéptido Tyr-Pro.

O agente anti-hipertensor obtido pelo processo do presente invento é usualmente uma mistura de péptidos, e pode conter outros péptidos diferentes do dipéptido Tyr-Pro. Para utilização como alimentos e bebidas, pode utilizar-se directamente os produtos purificados do líquido de cultura contendo o dipéptido Tyr-Pro. Em alternativa, o agente pode ser pulverizado por secagem por congelação, secagem por pulverização ou secagem em secador de tambor, antes da utilização.

A quantidade eficaz do agente anti-hipertensor do presente invento varia em função da idade e condição do paciente, e está na gama de 0,05 a 10 mg/kg de massa corporal/dia. É preferível administrar 0,3 a 3,0 mg/kg de massa corporal/dia. Se a dose não for inferior a 0,05 mg/kg de massa corporal/dia pode esperar-se efeito suficiente. Se a dose não for superior a 10 mg/kg de massa corporal/dia, o efeito pode ser exibido eficazmente.

O dipéptido Tyr-Pro foi administrado oralmente a ratinhos WKY apresentando pressão sanguínea normal (18 semanas de idade, massa corporal de 320 g, n=5) numa quantidade de 10 mg/kg de massa corporal/dia continuamente durante um mês, e não se verificou qualquer anormalidade no comportamento, aparência, pressão sanguínea e autópsia dos ratinhos. Seres humanos ingeriram alimentos fermentados com bactérias *Lactobacillus* durante muito tempo, e portanto assume-se que o Tyr-Pro contido no agente anti-hipertensor do presente invento não possui problemas de segurança.

Uma vez que o agente anti-hipertensor do presente invento contém dipéptido Tyr-Pro como componente activo, pode reduzir a pressão sanguínea em doses significativamente baixas, quando comparado com os péptidos anti-hipertensores derivados de materiais alimentares referidos até à data. Além disso, o agente anti-hipertensor do presente invento é muito seguro, e portanto pode ser utilizado como medicamento, alimentos para utilização específica em saúde e alimentos saudáveis.

Uma vez que o processo do presente invento inclui a cultura de bactérias de ácido láctico num meio contendo um péptido e/ou uma proteína, o agente anti-hipertensor contendo dipéptido Tyr-Pro com elevada segurança como componente activo pode ser facilmente produzido com baixo custo a partir de um material tal como péptidos e proteínas naturais.

O presente invento será explicado com mais detalhe com referência a Exemplos que são apresentados apenas para ilustração e não se destinam a limitar o invento.

Exemplo de Preparação 1

Inocularam-se 10 kg de uma solução aquosa a 9% em peso de pulverizados de leite magro com 300 g de leite fermentado, fermentado com *Lactobacillus helveticus* CPN4 (FERM BP-4835) como iniciador de bactérias de ácido láctico. Incubou-se a solução inoculada a 37°C durante 8 horas. Quando se formou a coalhada e o pH atingiu 4,2, terminou-se a incubação e arrefeceu-se a solução. Na solução de leite fermentado obtido, estava contido 1,0 mg/100 g de dipéptido Tyr-Pro.

Centrifugaram-se a 10000 rpm, durante 10 minutos, 10 kg da solução de leite fermentado obtida para retirar 8,4 kg de soro de leite coalhado. No soro de leite coalhado, estavam contidos 1,1 mg/100 g de dipéptido Tyr-Pro.

A estirpe CPN4 de *L. helveticus* pertence a *L. helveticus*, e foi depositada no *National Institute of Bioscience* e na *Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology* em 17 de Outubro de 1994, e foi concedido o número de matrícula FERM BP-4835. O FERM BP-4835 foi aceite para depósito sob o Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para Fins de Procedimento de Patentes. Todas as restrições sobre a disponibilidade ao público de FERM BP-4835 serão irrevogavelmente removidas na concessão de uma patente.

Exemplo 1

Submeteram-se 120 mg do soro de leite coalhado obtido no Exemplo de Preparação 1 a um tratamento de absorção através de cartuchos 10 sep-pak (WATERS INC.), e subsequentemente a um tratamento de eluição em várias condições apresentadas no Quadro 1 com um acetonitrilo contendo 0,1% em peso de TFA (ácido trifluoroacético) (solução B) diluído com uma solução aquosa contendo 0,1% em peso de TFA (solução A). Uma amostra eluída sem absorção e amostras eluídas em cada condição foram definidas como Fracções 1 a 6, respectivamente. Secou-se por congelamento cada fracção e dissolveu-se em 40 ml de salino fisiológico para preparar as Amostras 1 a 6.

Administrou-se o soro de leite coalhado obtido antes do fraccionamento e as Amostras 1 a 6 a ratinhos espontaneamente hipertensos (SHR: de CHARLES RIVER JAPAN INC., cinco ratinhos por grupo, 20 a 22 semanas de idade, machos) com uma sonda no estômago numa quantidade de 1 ml/animal. Comparou-se a alteração na pressão sanguínea máxima após seis horas com a de um grupo de controlo ao qual foi administrado salino fisiológico. Efectuou-se a medição da pressão sanguínea pelo método de pancada na cauda usando um aparelho de medição de pressão sanguínea não invasivo (nome comercial “PE 300”, NARKO BIO-SYSTEMS, CO., LTD.). Como resultado, observou-se um efeito anti-hipertensor significativo na Amostra 2 conforme

se apresenta no Quadro 1. Deste modo, considerou-se activa a Fracção 2.

Quadro 1

Amostra	Razão de solução B (%)	Redução de pressão sanguínea após 6 horas (ΔSBP±EP)
Antes do fraccionamento	-	-29,6±9,5 ***
Fracção 1	não absorvido	-9,6±5,7 *
Fracção 2	0-10	-22,3±3,2 *** (Fracção activa)
Fracção 3	10-15	-8,1±2,6
Fracção 4	15-20	1,0±6,3
Fracção 5	20-30	-8,8±8,5 *
Fracção 6	30-50	-7,6±5,3
Controlo (salino fisiológico)		1,9±8,1

***; P<0,001, *; P<0,05

Subsequentemente, submeteu-se a Amostra 2 a um tratamento de eluição por cromatografia líquida de alta eficiência de fase inversa (HPLC) nas condições que se seguem de acordo com o tempo de eluição apresentado no Quadro 2, para fraccionar ainda a Amostra 2 em quatro Fracções 2-1 a 2-4. A quantidade de aplicação de Amostra 2 numa eluição foi 1 ml e a eluição foi repetida 15 vezes. Isto é, fraccionou-se um total de 15 ml de Amostra 2.

- Bomba, L6200 INTELLIGENT fabricada por HITACHI LTD.;
- Detector, detector de UV L4000 fabricado por HITACHI LTD.;
- Coluna, WATERS MICROBONDASPHERE 5μC18, fabricada por NIHON MILLIPORE LTD., Tóquio, Japão;
- Eluente: Solução A (solução aquosa de ácido trifluoro-acético (TFA) a 0,1% em peso); e Solução B (acetonitrilo contendo 0,1% em peso de TFA);
- Gradiente: gradiente linear de 0% de Solução B (100% de Solução A) a 40% de Solução B (60% de Solução A) (0 a 60 minutos);
- Caudal, 1 ml/min.

Secaram-se por congelamento as Fracções 2-1 a 2-4, e dissolveram-se em 15 ml de salino fisiológico para preparar Amostras 2-1 a 2-4. Administraram-se oralmente essas amostras a SHR com uma sonda no estômago numa quantidade de 1 ml/animal, e comparou-se a alteração na pressão sanguínea máxima após seis horas com a de um grupo de controlo ao qual

foi administrado salino fisiológico, na mesma maneira que anteriormente, para examinar o efeito anti-hipertensor. Como resultado, observou-se um significativo efeito anti-hipertensor na Fracção 2-2 conforme está apresentado no Quadro 2. Deste modo, considerou-se a Fracção 2-2 uma fracção activa.

Quadro 2

Amostra	Tempo de eluição (min)	Redução de Pressão sanguínea Após 6 horas (ΔSBP±EP)
Fracção 2-1	10,5-16	-13,0±2,8 **
Fracção 2-2	16-19	-35,0±9,7 *** (Fracção activa)
Fracção 2-3	19-23	-2,8±5,3
Fracção 2-4	23-29	-3,6±5,6
Controlo (salino fisiológico)		2,6±6,0

***; P<0,001, **; P<0,01

Submeteu-se 1 ml de Amostra 2-2 a tratamento de eluição pela HPLC nas mesmas condições que as anteriores excepto o facto de se ter seguido as condições a seguir mencionadas:

- Gradiente: gradiente linear de 5% de Solução B (95% de Solução A) a 20% de Solução B (80% de Solução A) (0 a 60 minutos);

Repetiu-se esta eluição dez vezes, ou seja, submeteu-se a eluição o total 10 ml de Amostra 2-2.

Secaram-se por congelamento cada uma das Fracções 2-2-1 a 2-2-5 obtidas e dissolveram-se em 10 ml de salino fisiológico para preparar Amostras 2-2-1 a 2-2-5. Administraram-se oralmente essas amostras a SHR com uma sonda no estômago numa quantidade de 1 ml/animal, e comparou-se a alteração na pressão sanguínea máxima após seis horas com a de um grupo de controlo ao qual foi administrado salino fisiológico, na mesma maneira que anteriormente, para examinar o efeito anti-hipertensor. Como resultado, observou-se um significativo efeito anti-hipertensor na Fracção 2-2-2 conforme está apresentado no Quadro 3.

Quadro 3

Amostra	Tempo de eluição (min)	Redução de Pressão sanguínea Após 6 horas (ΔSBP±EP)
Fracção 2-2-1	21,8	-6,6±5,5
Fracção 2-2-2	22,7	-23,0±6,2 *** (Fracção activa)
Fracção 2-2-3	24,0	-9,0±6,5 *
Fracção 2-2-4	25,2	-6,2±6,2
Fracção 2-2-5	25,8	-3,5±4,8
Controlo (salino fisiológico)		2,6±6,0

***; P<0,001, *; P<0,05

Submeteu-se 1 ml de Amostra 2-2-2 a tratamento de eluição por HPLC nas mesmas condições que as do tratamento da Amostra 2-2 para purificar a amostra, e analisou-se a sua sequência de aminoácidos a partir da extremidade N com "Sequenciador automático de Proteínas PPSQ-10 SYSTEM" fabricado por SHIMADZU CO. Como consequência, confirmou-se que a sequência de aminoácidos Tyr-Pro estava contida. Em alternativa, realizou-se a hidrólise do péptido purificado com ácido clorídrico 6N à temperatura de 105°C durante 24 horas, e efectuou-se a análise de aminoácidos com um sistema de análise de aminoácidos de velocidade elevada (nome comercial "*Amino Acid Analysis System*" fabricado por NIHON BUNKOU KOUGYO Co.). Como resultado, confirmou-se que os aminoácidos Tyr e Pro estavam contidos em moles iguais. Concluiu-se, portanto, que o péptido obtido era um dipéptido que possuía a sequência Tyr-Pro.

Exemplo de Preparação 2

Inocularam-se 100 kg de uma solução aquosa de pulverizados de leite desnatado a 9% em peso com 3 kg de leite fermentado com *L. helveticus* CPN4 (FERM BP-4835), e efectuou-se a cultura a 37°C durante 20 horas. Tratou-se a solução de leite fermentado assim obtido num separador centrífugo Sharpless a 10000 rpm, para retirar 78 kg de soro de leite. Subsequentemente, aplicou-se o soro de leite a uma coluna de enchimento C18 preparativa (3 litros de capacidade, fabricada por WATERS INC.). Lavou-se então a coluna com 10 kg de uma solução aquosa a 5% de acetonitrilo, seguido de um tratamento de eluição com 5 kg de uma solução aquosa a 10% de acetonitrilo. A fracção eluída originou 1186 mg de produto seco por congelação. Esse produto seco por congelação

continha 652 mg de dipéptido Tyr-Pro. A pureza do dipéptido Tyr-Pro foi de 55%.

Exemplo 2

Examinou-se o efeito anti-hipertensor da solução de leite fermentado obtido no Exemplo de Preparação 1. Realizou-se a medição do efeito anti-hipertensor utilizando SHR em conformidade com o processo do Exemplo 1. Administrou-se oralmente a SHR 4 ml/animal (12 ml/kg de massa corporal) da solução de leite fermentado ou de uma solução de leite não fermentado, e mediu-se a pressão sanguínea máxima após seis horas. Como resultado, confirmou-se o efeito anti-hipertensor. Os resultados encontram-se apresentados no Quadro 4.

Quadro 4

Amostra	Redução da pressão sanguínea após 6 horas (ΔSBP±EP)
Solução de leite não fermentado	-3,5±4,2
Solução de leite fermentado com CPN4	-20,3±5,2 ***

***; P<0,001

Exemplo 3

Sintetizou-se em fase sólida o péptido anti-hipertensor Tyr-Pro identificado no Exemplo 1 com um sintetizador automático de péptidos PPSM-8 fabricado por SHIMADZU CO. O tempo de eluição do péptido Tyr-Pro obtido na HPLC foi o mesmo que o do péptido purificado no Exemplo 1.

Confirmou-se o efeito anti-hipertensor do péptido sintetizado pelo seguinte método. Administrou-se oralmente a SHR 0,05, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 ou 10 mg/kg de massa corporal do péptido sintetizado Tyr-Pro, e mediu-se a pressão sanguínea máxima após seis horas e comparou-se com o de um grupo de controlo ao qual foi administrado salino fisiológico, no mesmo modo que no Exemplo 1. Os resultados encontram-se no Quadro 5. A partir dos resultados no Quadro 5, confirmou-se o efeito dependente da dose numa gama de 0,05 a 3,0 mg/kg de massa corporal.

Quadro 5

Quantidade de Tyr-Pro (mg/kg)	Redução da pressão sanguínea após 6 horas (ΔSBP±EP)
10	−32,1±7,4 ***
3	−30,5±6,7 ***
1	−27,4±7,1 ***
0,3	−20,8±4,1 ***
0,1	−10,2±4,0 *
0,05	−8,1±3,3
Controlo (salino fisiológico)	−3,6±2,1

***; P<0,001, *; P<0,05

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para preparação de um agente anti-hipertensor, em que o agente anti-hipertensor compreende uma quantidade eficaz de péptidos seleccionados do grupo que consiste num dipéptido Tyr-Pro, um sal farmaceuticamente aceitável do dipéptido Tyr-Pro, e suas misturas, compreendendo o referido processo os passos de:

- efectuar a cultura de bactérias de ácido láctico do género *Lactobacillus* num meio que contém um péptido e/ou proteína incluindo uma sequência de aminoácidos Tyr-Pro, para obter um líquido de cultura contendo o dipéptido Tyr-Pro;
- centrifugação do referido líquido de cultura que contém o dipéptido Tyr-Pro para obter um sobrenadante; e
- purificação do referido sobrenadante com uma resina de fase inversa por absorção e eluição do dipéptido Tyr-Pro, aumentando assim a concentração do dipéptido.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o referido meio é seleccionado do grupo que consiste em leite inteiro animal, leite desnatado animal, caseína de leite animal, milho, proteína de milho, trigo, proteína de trigo, soja, soja deslipidada, proteína de soja, caldo de fígado de Briggs, caldo de MRS e suas misturas.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que as referidas bactérias de ácido láctico do género *Lactobacillus* são *L. helveticus*.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o referido passo de cultura é efectuado a 20 a 50°C durante 3 a 48 horas.

5. Processo para preparação do agente anti-hipertensor de acordo com a reivindicação 1, em que o referido passo de cultura é efectuado num meio possuindo um pH numa gama de 3,5 a 7.

Lisboa,