INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 753526 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A61K038/06 A A23L001/305 B
A23K001/16 B A23G001/00 B

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

(22) *Data de depósito:* 1994.02.24

(30) *Prioridade:* 1993.03.24 JP 6564393

(43) *Data de publicação do pedido:*
1997.01.15

(45) *Data e BPI da concessão:*
2000.12.20

(73) *Titular(es):*
ITOHAM FOODS INC.
2-1, BINGOCHO 3-CHOME, NADA-KU KOBE-SHI, HYOGO 657 JP

HANKYU-KYOEI BUSSAN CO., LTD.
8-7, KADOTACHO, KITA-KU OSAKA-SHI, OSAKA 530 JP

(72) *Inventor(es):*

KYOICHI KAGAWA JP
CHIZUKO FUKUHAMA JP
HISAKO MATSUTAKA JP
TORU IGUCHI JP
TOYOO NAKAMURA JP

(74) *Mandatário(s):*
JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PÉPTIDO INIBIDOR DA DIFERENCIAÇÃO DOS ADIPÓCITOS DA DIFERENCIAÇÃO DOS ADIPÓCITOS QUE CONTÉM O REFERIDO PÉPTIDO COMO INGREDIENTE ACTIVO

(57) *Resumo:*

PÉPTIDO INIBIDOR DA DIFERENCIAÇÃO DOS ADIPÓCITOS E INIBIDOR DA DIFERENCIAÇÃO DOS ADIPÓCITOS QUE CONTÉM O REFERIDO PÉPTIDO COMO INGREDIENTE ACTIVO

Campo das Cebolas - 1100 LISBOA
Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3
Linha azul: 01 888 10 78 • Fax: 01 887 53 08 - 886 00 66
E-mail: inpi @ mail. telepac. pt

REF.: N.70441 – LR/cpq

INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV	MOD. UTI.	MOD. IND.	DES. IND.	TOP. SEMIC.
X	☐	☐	☐	☐

N.º Objectos ☐ N.º Desenhos ☐

N.º 753.526 (11) DATA DO PEDIDO ___/___/___ (22)

CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)

REQUERENTE (71) (NOME E MORADA) **ITOHAM FOODS INC.**, japonesa, industrial, com sede em 2-1, Bingocho 3-chome, Nada-ku, Kobe-shi, Hyogo 657, Japão e **HANKYU-KYOEI BUSSAN CO., LTD.**, japonesa, industrial, com sede em 8-7, Kadotacho, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530, Japão

CODIGO POSTAL ☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐

INVENTOR(ES) AUTOR(ES) (72)

KAGAWA, KYOICHI; FUKUHAMA, CHIZUKO; MATSUTAKA, HISAKO; IGUCHI, TORU; NAKAMURA, TOYOO; NUMATA, MASAHIRO e WATANABE, SHIGEAKI

REIVINDICAÇAO DE PRIORIDADE(S) (30)

DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO

FIGURA (para interpretação do resumo)

EPÍGRAFE (54)

"PÉPTIDO INIBIDOR DA DIFERENCIAÇÃO DOS ADIPÓCITOS E INIBIDOR DA DIFERENCIAÇÃO DOS ADIPÓCITOS QUE CONTÉM O REFERIDO PÉPTIDO COMO INGREDIENTE ACTIVO"

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

RESUMO (max. 150 palavras) (57)

A invenção descreve um péptido que possui actividade inibidora da diferenciação dos adipócitos e que tem uma sequência de aminoácidos Val-Tir-Pro ou Val-Thr-Leu e descreve também um inibidor da diferenciação dos adipócitos, um alimento saudável ou uma ração para animais, contendo cada um destes produtos como ingrediente activo o péptido ou um produto de degradação de proteínas que contenha pelo menos 0,1% em peso desse péptido. De acordo com a presente invenção é possível evitar ou tratar a obesidade de seres humanos ou

Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA
Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3
Linha azul: 01 888 10 78 • Fax: 01 887 53 08 - 886 00 66
E-mail: inpi @ mail. telepac. pt

INPI
INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

FOLHA DO RESUMO (Continuação)

PAT. INV.	MOD. UTI.	MOD. IND.	DES. IND.	TOP. SEMIC.	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
☐	☐	☐	☐	☐	
		N.º Objectos ☐	N.º Desenhos ☐		
N.º ☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐ ☐☐ (11)		DATA DO PEDIDO ___/___/___ (22)			

RESUMO (continuação) (57)

nos animais e as doenças do sistema circulatório a elas associadas, tais como a hipertensão e a arteriosclerose. A invenção refere que também é possível melhorar a qualidade da carne dos animais domésticos para abate ou dos peixes de piscicultura.

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

PT 58536

Descrição

"Péptido inibidor da diferenciação dos adipócitos e inibidor da diferenciação dos adipócitos que contém o referido péptido como ingrediente activo"

A presente invenção diz respeito à inibição da diferenciação dos adipócitos.

Sabe-se que a ingestão excessiva de gorduras e de hidratos de carbono induz a obesidade e a hiperlipidémia, o que em última instância conduz ao aparecimento de hipertensão e arteriosclerose. Por tal motivo, o desejo manifesto de se reprimir a absorção de gorduras e de hidratos de carbono e de se fazer diminuir a acumulação de gorduras conta com adeptos entusiásticos.

As crianças, quando expostas a uma ingestão excessiva de alimentos, sofrem um aumento de adipócitos e assumem um estado que pode ser perfeitamente designado por obesidade potencial. Por tal motivo, foi já afirmado que a repressão do aumento do número de adipócitos, em particular nas crianças, tem consequências directas sobre a prevenção da obesidade e das doenças cardiovasculares, que podem ser perfeitamente englobadas na categoria das chamadas complicações de obesidade nos adolescentes e consequentemente nos adultos.

Para a terapia da obesidade e da hiperlipidemia tem sido moda aplicar medidas tais como a limitação do consumo de carne, a ingestão de alimentos dietéticos (por exemplo, fibras) e ainda a administração de diversos medicamentos. Os medicamentos do domínio de utilização popular são, por exemplo, o sulfato de dextrano que reforça a actividade das lipases das lipo-proteínas, o nicomol que inibe a absorção dos lípidos, em especial do colesterol, e o clofibrato e a pravastatina que são agentes para melhorar o metabolismo dos lípidos.

Infelizmente, a limitação do consumo de carne é angustiante para as pessoas coagidas a tal procedimento e a administração de medicamentos do grupo referido antes induz possivelmente efeitos secundários.

Os animais domésticos para a produção de carne e os peixes criados em piscicultura são presentemente alimentados com alimentos enriquecidos cuja finalidade é a de favorecerem o crescimento. Em consequência, na carne de tais animais e peixes há teores em gordura excessivamente elevados. Posto isto, os elementos enriquecidos fazem com que os animais domésticos para a produção de carne e os peixes criados em piscicultura ingiram gorduras em quantidades excessivas e levam à degradação do sabor das respectivas carnes para parâmetros que ficam abaixo do nível de satisfação do gosto dos consumidores.

A patente de invenção EP-A-420979 divulga uma substância que contém um oligopeptido, desenvolvida por investigadores entre os quais está um dos inventores que trabalharam no presente pedido de patente de invenção. Na patente de invenção JP-A-02-154 693 também está descrita uma técnica semelhante a essa.

Estas publicações de patentes de invenção explicam claramente que há determinadas espécies de oligopeptidos que são eficazes para melhorar o metabolismo dos lípidos. No entanto, nesses documentos não há nenhuma passagem que diga respeito à inibição da diferenciação dos adipócitos.

A substância que contém os oligopeptidos, descrita no documento, EP-A-420979, é uma mistura de hidrolisados de proteínas na composição. A sequência de aminoácidos do verdadeiro componente activo desta substância, designadamente de um péptido que é um componente activo, não está demonstrada.

Este facto implica que a pureza da substância que contém o péptido é muito baixa para que possa ser utilizada como medicamento. Esta substância não permite uma regulação perfeita

da qualidade, uma vez que ao ser incorporada nos alimentos não pode ser quantificada com facilidade e separadamente do péptido inerente ao alimento.

O documento EP-A-044032 descreve uma composição de péptidos de baixo peso molecular seleccionados principalmente entre dipeptidos e tripeptidos produzidos por proteólise enzimática de um material proteínico no seu estado natural. Também descreve um agente nutriente que incorpora essa composição. O documento EP-A-044032 explica que a composição é útil para fazer baixar o índice de colesterol no sangue. Não há nenhuma explicação respeitante à inibição da diferenciação dos adipócitos.

O documento JP-A-3-31298 descreve diversos péptidos específicos utilizáveis no tratamento da amnésia. O documento JP-A-3-31298 não aborda a inibição da diferenciação dos adipócitos.

Böhlen *et al.*, em 'Int. J. Peptide Protein Res.' 16,1980, 306-310, descrevem um processo novo para purificar péptidos. Nessa obra não há nenhuma preocupação respeitante à utilização terapêutica ou não terapêutica dos péptidos.

Ishibashi *et al.*, em 'Agric. Biol. Chem. 52', 1988, 95-98, dissertam sobre o sabor de alguns péptidos que contêm prolina. Não há nenhuma análise respeitante a qualquer outro efeito terapêutico ou não terapêutico.

A presente invenção tem por objecto proporcionar um agente inibidor da diferenciação dos adipócitos, cujo componente activo é um péptido, e também tem por objecto proporcionar um agente inibidor da diferenciação dos adipócitos, o qual possui como um dos seus componentes activos uma substância que contém oligopeptidos, obtida a partir de uma proteína específica.

Assim sendo, a presente invenção proporciona a utilização de um tripeptido que possui a sequência de aminoácidos Val-Tir-Pro ou Val-Thr-Leu para a produção de um medicamento

para tratar ou prevenir uma doença em que esteja implicada a diferenciação dos adipócitos. A invenção proporciona também a utilização de um tripeptido que possui uma sequência de aminoácidos Val-Tir-Pro ou Val-Thr-Leu para a produção de um alimento saudável ou uma ração para animais para tratar ou evitar uma doença em que esteja implicada a diferenciação dos adipócitos. De forma tipica, a doença em causa é a obesidade ou uma doença cardiovascular daí resultante, tal como a hipertensão ou a arteriosclerose.

A presente invenção proporciona também a utilização de um proteolisado que contenha no mínimo 0,1% em peso de um tripeptido que possua uma sequência de aminoácidos Val-Tir-Pro ou Val-Thr-Leu para a produção de um alimento saudável ou de uma ração para animais para tratar ou prevenir doenças em que esteja implicada a diferenciação dos adipócitos.

A presente invenção proporciona também a utilização não terapêutica de um tripeptido ou de um proteolisado, tal como definido *supra*, para inibir a diferenciação dos adipócitos. A presente invenção também proporciona a utilização não terapêutica de um alimento saudável que contenha um tripeptido ou um proteolisado, tal como definido *supra*, para inibir a diferenciação dos adipócitos.

A presente invenção proporciona também um método não terapêutico para melhorar a qualidade da carne de animais domésticos para abate ou de peixes de piscicultura, consistindo tal método em alimentar os referidos animais ou peixes com uma quantidade eficaz de um tripeptido do tipo descrito *supra*. A invenção proporciona ainda a utilização não terapêutica de um tripeptido do tipo anteriormente referido para melhorar a qualidade da carne dos animais domésticos para abate ou dos peixes criados em piscicultura.

A presente invenção proporciona também um método não terapêutico para melhorar a qualidade da carne dos animais domésticos ou dos peixes criados em piscicultura, consistindo

tal método em alimentar os referidos animais ou peixes com uma quantidade eficaz de um proteolisado que contenha no mínimo 0,1% em peso de um tripeptido que possua a sequência de aminoácidos Val-Tir-Pro ou Val-Thr-Leu. A invenção proporciona ainda a utilização não terapêutica de um proteolisado que contenha no mínimo 0,1% em peso de um tripeptido que possua uma sequência de aminoácidos Val-Tir-Pro ou Val-Thr-Leu, para melhorar a qualidade da carne dos animais domésticos para abate ou dos peixes criados em piscicultura,

Seguidamente descrever-se-á a presente invenção minuciosamente. Os tripeptidos Val-Tir-Pro e Val-Thr-Leu podem ser isolados por refinação de proteínas vulgarmente existente no mundo natural. Também podem ser directamente sintetizados por via química em conformidade com métodos conhecidos. Em alternativa, os péptidos da presente invenção podem ser produzidos mediante a preparação de um oligonucleótido que possua uma sequência de base correspondente a uma das sequência de aminoácidos referidas antes, efectuando-se depois a inserção deste oligonucleótido num vector de expressão adequado e induzindo a expressão dos péptidos num hospedeiro conveniente.

A. Seguidamente efectuar-se-á a descrição de um procedimento para isolar os péptidos por refinação de proteínas que ocorrem vulgarmente no mundo natural.

Como matérias-primas é possível utilizar todas as proteínas de origem animal, tais como as proteínas das partes comestíveis dos peixes, da farinha de peixe e ainda globina e proteínas de origem vegetal, tais como o glúten do trigo e a caseína de soja.

As proteínas globínicas, tais como a hemoglobina e a mioglobina, entre outras proteínas mencionadas antes, são particularmente vantajosas em termos de uma manifestação forte do efeito esperado de inibição da diferenciação dos adipócitos.

As espécies animais fornecedoras destas proteínas globínicas não estão particularmente limitadas. É possível utilizar sem restrições o sangue retirado de bovinos, suínos, ovinos, seres humanos, equídeos, etc..

Depois disto, a proteína indicada tem de ser hidrolisada. O procedimento para esta hidrólise pode ser o do método descrito no documento EP-A-4209789. As enzimas hidrolíticas que é possivel utilizar com eficiência na presente invenção são seleccionadas, por exemplo, entre proteases ácidas, proteases neutras e proteases alcalinas. Podem ser utilizadas por si sós ou sob a forma de uma mistura de duas ou mais.

Seguidamente descrever-se-á as condições em que é possível hidrolisar as proteínas globínicas.

Hidrolisa-se uma substância que contenha proteínas globínicas efectuando em primeiro lugar a dispersão dessa substância em água, segundo uma concentração compreendida no intervalo entre 5% e 30% em peso, tomando por base a quantidade de sólidos, ajustando a dispersão resultante com um ácido ou com uma substância alcalina para se obter um valor de pH óptimo para uma protease, adicionando a protease de uma só vez ou gradualmente à dispersão que já está ao valor óptimo de pH e aquecendo a mistura a uma temperatura compreendida no intervalo entre 20°C e 70°C durante um período de 3 a 48 horas para que a enzima reaja com o substrato.

Depois é possível obter um proteolisado, que tem o efeito de inibir a diferenciação dos adipócitos (doravante aqui designado por "hidrolisado da invenção"), secando o proteolisado resultante ou combinando este proteolisado com uma quantidade adequada de uma carga diluente, tal como a carboximetil-celulose ou a dextrina, e secando a mistura resultante até solidificar.

Este hidrolisado da invenção contém o péptido da presente invenção, Val-Tir-Pro e/ou Val-Thr-Leu, com uma concentração não inferior a 0,1% em peso.

A seguir é possível purificar o proteolisado da presente invenção resultante do tratamento com a enzima. Para esta purificação é possível recorrer a todos os métodos de purificação bem conhecidos.

Dito de forma concreta, é possível produzir uma fracção que contenha um péptido pretendido, num estado purificado, combinando convenientemente o método em que se utiliza uma resina de permuta iónica, o método de ultrafiltração, o método de cromatografia de fase inversa, etc..

O procedimento de isolamento referido antes nem sempre necessita que se recorra ao método em que se utiliza a resina de permuta iónica ou ao método de ultrafiltração. No entanto, sob o ponto de vista da refinação máxima do grau de isolamento e purificação, introduz-se vantajosamente no procedimento a prática de tais métodos.

O isolamento e a purificação realizam-se combinando a operação de cromatografia de fase inversa em meio ácido e a operação de cromatografia de fase inversa em meio neutro. O teor proteico da fracção pode ser determinado por todos os métodos bem conhecidos para a determinação de proteínas, por exemplo, o método da ninidrina.

Ao fazer-se a identificação da sequência de aminoácidos da fracção separada conforme descrito antes, de acordo com o método bem conhecido, é possível confirmar a presença dos péptidos da presente invenção, Val-Tir-Pro e Val-Thr-Leu, nesta fracção.

O péptido da presente invenção, cuja origem está na fracção isolada conforme descrito antes, pode ser utilizado de acordo com a invenção.

A fracção isolada conforme descrito antes também pode ser utilizada directamente de acordo com a invenção.

O péptido Val-Tir-Pro ou Val-Thr-Leu pode ser sintetizado quimicamente por métodos bem conhccidos da síntese peptídica. Como exemplos concretos de métodos de síntese refere-se os métodos seleccionados entre método da azida, método do cloreto de ácido, método do anidrido de ácido, método do anidrido de ácido misto, método de DCC, método do éster activado, método do carbodiimidazol, método redox e método aditivo ao DCC (HOMB, HOBt, HOSu) [é possível citar a obra "The Peptide", Vol. 1 (1966) escrita por Schreder e Luhke e publicada por "Academic Press", Nova Iorque, E.U.A., ou a obra "Synthesis of Peptides" escrita por Izumitani *et al.* e publicada por Maruzen Co., Ltd. (1975)].

O método para a síntese de um péptido referido *supra* pode ser implementado como síntese em fase sólida ou síntese em fase líquida.

Além do mais, na aplicação do método para a síntese de um péptido mencionado antes, os aminoácidos que possuem um grupo funcional na cadeia lateral, tais como, por exemplo, a tirosina e a treonina, têm preferencialmente os grupos funcionais relevantes da cadeia lateral protegidos no decurso da síntese. Para efeitos desta protecção é possível utilizar grupos protectores bem conhecidos tais como, por exemplo, o grupo benziloxicarbonilo (Cbz-), o grupo t-butoxicarbonilo (Boc-) e o grupo benzilo (Bz-).

Refere-se a propósito que o grupo protector pode ser removido pelo método bem conhecido no processo de síntese do péptido da presente invenção.

B. O agente inibidor da diferenciação dos adipócitos pode ser produzido utilizando o péptido da presente invenção como um dos seus componentes activos.

Como veículo para o agente inibidor da diferenciação é possível utilizar todos os excipientes ou diluentes seleccionados entre cargas, agentes para aumentar o volume, aglutinantes,

agentes humectantes, agentes desintegradores e agentes tensioactivos que são vulgarmente utilizados para a preparação de um agente químico numa forma conveniente para utilização corrente. A forma da composição do agente químico não está sujeita a nenhuma restrição particular, com a excepção de ser obrigatório que seja capaz de conter eficientemente o péptido da presente invenção. Como exemplos concretos de formas da composição refere-se os sólidos tais como pastilhas, pós, grânulos e pílulas e refere-se também as soluções, as suspensões e as emulsões que são adequadas para administração por injecção. De um modo facultativo, é possível produzir o agente químico sob a forma de uma preparação anidra que pode ser liquefeita antes da sua utilização, mediante a adição de um veículo adequado. Todos estes agentes químicos podem ser produzidos por métodos vulgares conhecidos na especialidade.

O regime de dosagem do agente inibidor da diferenciação dos adipócitos é escolhido convenientemente em conformidade com o método de administração do agente, a forma de administração, os sintomas de um paciente que necessite dessa administração e não só.

De um modo geral, prepara-se o agente químico preferencialmente sob uma forma que contenha o péptido da presente invenção numa concentração compreendida aproximadamente no intervalo entre 0,001% e 80% em peso e administra-se segundo uma dose que contenha o péptido da presente invenção com uma concentração compreendida aproximadamente no intervalo entre 1 mg e100 mg por adulto por dia. Os medicamentos nas diversas formas referidas antes são administrados pelas vias adequadas a essas formas particulares. Os que estejam contidos nas formas convenientes para injecção são administrados, por exemplo, por injecção intravenosa, por injecção intramuscular, por injecção hipodérmica, por injecção intradermal e por injecção intra-abdominal e os que estiverem contidos numa forma sólida são administrados por via oral.

C. Os referidos tripeptidos ou proteolisados podem ser utilizados, de acordo com a invenção, para a produção de um alimento saudável (os chamados alimentos fisiologicamente funcionais).

Os alimentos funcionais podem ser produzidos utilizando o péptido ou o proteolisado como um aditivo para os alimentos vulgares.

As espécies de alimentos saudáveis que é possível produzir, conforme se disse antes, não são especificamente restritas. Como exemplos concretos de alimentos saudáveis que contêm o péptido da presente invenção refere-se os seleccionados entre leite, pudins, caril, fricassé, guisados, molho de carne, presunto, bolos e chocolates.

Entre os alimentos anteriormente enumerados, o leite é particularmente vantajoso na medida em que permite que o péptido da presente invenção, cujo sabor faz com que dificilmente seja ingerido directamente pelas crianças, passe a ser facilmente ingerido. Além do mais, a adição do péptido da invenção a alimentos como os bolos e os chocolates que favorecem inerentemente a obesidade, é vantajosa para evitar a obesidade resultante da ingestão de tais alimentos.

A quantidade de péptido da presente invenção que irá ser incorporada nos alimentos anteriormente enumerados é escolhida convenientemente em conformidade com o tipo de alimento, a finalidade dessa adição, o efeito esperado pela ingestão do alimento e não só.

De um modo geral, o péptido da invenção é incorporado preferencialmente no alimento numa quantidade tal que a sua ingestão permita ingerir o referido péptido numa quantidade compreendida aproximadamente no intervalo entre 0,1 mg e 4 mg por refeição.

D. É possível preparar uma ração para animais, possuindo essa ração capacidade para inibir a diferenciação dos adipócitos, em conformidade com a presente invenção, juntando o péptido da invenção a essa ração.

Para efeitos de adição às rações para animais, convém que o péptido da invenção seja igualmente adequado para animais domésticos de abate, tais como bovinos, suínos e galináceos e para rações para peixes de piscicultura, tais como sargos e douradas juvenis.

A quantidade de péptido da invenção adicionável à ração é escolhida convenientemente em conformidade com o tipo de ração, o efeito previsto pela ingestão da ração e não só.

De um modo geral, o péptido da invenção é acrescentado preferencialmente à ração numa quantidade tal que esta contenha o péptido com uma concentração compreendida no intervalo entre 0,1% e 4% em peso.

Exemplos

Seguidamente descrever-se-á a invenção de forma mais concreta tomando como referência os exemplos. Faz-se observar que o âmbito técnico da presente invenção não fica limitado por estes exemplos.

[Exemplo 1] Pesquisa do proteolisado que possua uma acção inibidora da diferenciação dos adipócitos.

Efectuou-se uma comparação entre globina e glúten do trigo enquanto fontes de proteínas capazes de conterem o péptido inibidor da diferenciação dos adipócitos. Efectuou-se a experiência utilizando como modelos de obesidade dietética murganhos obesos com excesso de gordura e murganhos obesos com excesso de açúcar. A obesidade de excesso de gordura desenvolveu-se deixando os murganhos ingerirem livremente rações alimentares com 50% de gordura nas quais havia sido incorporada banha de porco à razão de 50% p/p, durante 2 semanas, e a obesidade por excesso de açúcar desenvolveu-se deixando os murganhos ingerirem livremente água potável que continha uma solução de sacarose na concentração de 30% p/v, para além

da ração normal. Deixou-se os grupos de murganhos de obesidade por excesso de gordura ingerirem livremente as rações onde se havia incorporado separadamente 4% de proteolisado de globina, 8% de proteolisado de globina, 2% de proteolisado de globina + 2% de proteolisado de glúten e 4% de proteolisado de globina + 4% de proteolisado de glúten na ração com 50% de gordura. Em contraposição deixou-se os grupos de murganhos de obesidade por excesso de açúcar ingerirem livremente rações onde se havia incorporado separadamente 2% de proteolisado de globina, 4% de proteolisado de globina, 1% de proteolisado de globina + 1% de proteolisado de glúten e 2% de proteolisado de globina + 2% de proteolisado de glúten, incorporados nas rações normais, para além da solução de sacarose a 30%. Os resultados obtidos estão agrupados no quadro 1.

No teste de obesidade por excesso de gordura, o grupo de contraprova da ração com gordura a 50% revelou um aumento de 190% ou de cerca de 2 vezes o peso do tecido adiposo epididimal, comparativamente com o grupo de contraprova alimentado com a ração normal, estando associados a este fenómeno um aumento de 50% do número de células dos tecidos e um aumento de 28% do tamanho das células. Os aumentos do peso do tecido adiposo, do número de células e do tamanho das células foram notavelmente reprimidos no grupo que ingeriu exclusivamente proteolisado de globina e a diminuição do número de células foi particularmente evidente neste grupo, comparativamente com o grupo em cuja ração alimentar se havia substituído metade do produto de digestão proteínico por proteolisado de glúten. De igual modo, no estudo da obesidade por excesso de açúcar, o proteolisado de globina revelou uma tendência mais forte para reprimir o aumento do número de adipócitos do que o proteolisado de glúten de trigo.

A partir destes resultados conclui-se que o proteolisado de globina se distingue pela sua acção para inibir a diferenciação dos adipócitos e presume-se que possua um elevado teor em péptidos inibidores da diferenciação dos adipócitos.

Os dados obtidos justificam a conclusão de que as proteínas globínicas constituem princípios preferíveis sem referência particular às fontes de proteínas.

Quadro 1. Efeito dos proteolisados sobre o aumento dos adipócitos.

Tratamento	Número de células[1]	Tamanho das células[2]	Peso dos tecidos[3]	Ganho de peso corporal[4]
Ração normal	17	7,5	0,89	22,8
Ração com 50% de gordura	25	9,6	1,70	25,0
+4% de proteolisado de globina	16	9,4	1,08	22,3
+8% de proteolisado de globina	15	9,9	1,05	22,3
+2% de proteolisado de globina + 2% de proteolisado de glúten	20	8,1	1,11	20,2
+4% de proteolisado de globina + 4% de proteolisado de glúten	19	8,5	1,14	21,7
Ração normal	15	9,5	0,98	18,0
Solução de sacarose a 50%	20	12,9	1,82	27,6
+2% de proteolisado de globina	14	9,4	1,46	21,9
+4% de proteolisado de globina	16	9,9	1,28	21,7
+1% de proteolisado de globina + 1% de proteolisado de glúten	19	8,1	1,44	20,8
+2% de proteolisado de globina + 2% de proteolisado de glúten	19	8,5	1,37	23,6

[1]: $x10^6$ células/tecido adiposo
[2]: gordura em mg/μg de ADN
[3]: peso (g) do tecido adiposo a envolver o epidídimo
[4]: aumento do peso corporal (g)

[Exemplo 2] Produção do proteolisado de globina

Seguidamente descrever-se-á de forma minuciosa um método para a produção de proteolisado de globina, utilizando eritrócitos do sangue de bovinos. Determinou-se a distribuição do peso molecular pelo método da cromatografia em gel (figura 1).

Esta cromatografia foi realizada nas condições a seguir enumeradas:

Aparelho: cromatógrafo em fase líquida de alto rendimento, modelo 'LC-6A, Shimadzu Corp.'.

Coluna: Poliidroxietil A, 5 μm 9,4 x 200 mm, 'Poly LC Inc.'.

Solvente para a eluição: ácido fórmico 50 mM.

Débito: 0,5 mL/minuto.

Detecção: absorção de ultravioletas (221 nm).

Utilizou-se um hemolisado completo, obtido por adição de 250 L de água a 100 kg de eritrócitos de sangue recente de bovinos, cujo valor de pH se ajustou para 2,8 por adição de ácido fosfórico, e depois deixou-se reagir com 2,6 $x10^7$ unidades de protease ácida de *Aspergillus niger* que lhe foram adicionadas a 50°C durante 3 horas.

A seguir à reacção aqueceu-se a solução de reacção a 80°C durante 30 minutos para interromper a reacção que estava a decorrer, ajustou-se então o valor do pH para 6,5 por adição da suspensão de hidróxido de cálcio em água, combinou-se com 10 kg de terras diatomáceas e filtrou-se utilizando uma prensa de filtração. Secou-se por aspersão o filtrado resultante para se obter 23 kg de um pó.

[Exemplo 3] Método para a purificação fraccional do péptido inibidor da diferenciação dos adipócitos

Obteve-se o péptido da invenção em conformidade com o procedimento seguinte: 1. permuta iónica, 2. ultrafiltração, 3. separação por cromatografia de coluna de fase inversa em estado acídico e 4. separação por cromatografia de fase inversa em estado neutro, conforme adiante se indica.

As percentagens das quantidades recuperadas mediantes a utilização destes passos estão indicadas no quadro 2. As quantidades de proteínas foram determinadas pelo método da ninidrina.

Quadro 2. Proporções de recuperação do péptido inibidor da diferenciação dos adipócitos a partir do proteolisado de globina

Fracção	Peso das proteínas (g)	Rendimento (%)	Método de determinação
proteolisado de globina	13,7	100	Método da ninidrina a seguir a hidrólise ácida
permuta iónica + ultrafiltração	4,24	30,9	Idem
cromatografia de fase inversa (acídica)	0,039	0,28	Análise de aminoácidos a seguir à hidrólise ácida
cromatografia de fase inversa (neutra)			
(1) Val-Thr-Leu (fracção B)	0,009	0,06	Idem
(2) Val-Tir-Pro (fracção C)	0,006	0,04	Idem

1. Permuta iónica

Preparou-se uma solução aquosa de proteolisado de globina a 10% p/v a que se adicionou resina de permuta catiónica fracamente acídica (Amberlite IRC50, forma H^+, produzida por 'Japan Organo Co., Ltd.') e agitou-se durante 1 hora para se induzir a adsorção e para se obter uma fracção não adsorvida.

2. Ultrafiltração

A fracção não adsorvida, obtida pelo tratamento de permuta iónica, foi submetida a ultrafiltração mediante a utilização de um dispositivo de ultrafiltração em meio agitado (UHP

90K produzido por 'Advantek Co., Ltd.') e utilizando uma membrana de ultrafiltração (peso molecular da fracção igual a 1000, UII 1, 'Advantec Co., Ltd.'), seguindo-se a recolha do filtrado.

3. Cromatografia de fase inversa (acídica) (figura 2)

Aparelho: cromatógrafo de fase líquida de elevado rendimento, modelo 'LCI-10A, Shimadzu Corp.'.

Coluna: 'SuperPac Pep-S', 15 μm, 22,5 x250 mm, 'Pharmacia Ltd.'.

Solvente para a eluição: solução aquosa de acetonitrilo contendo 0,1% de ácido trifluoroacético, variando a concentração de acetonitrilo linearmente desde 2% até 35% à razão de 1%/minuto.

Caudal: 5 mL/minuto.

Temperatura: 50°C.

Detecção: 220 nm.

Tempo para o fraccionamento (fracção A): 39,9 a 40,4 minutos.

4. Cromatografia de fase inversa (neutra) (figura 3)

Aparelho: cromatógrafo de fase líquida de elevado rendimento, modelo 'LC-10A, Shimadzu Corp.'.

Coluna: 'SuperPac Pep-S', 15 μm, 22,5 x250 mm, 'Pharmacia Ltd.'.

Solvente para a eluição: solução aquosa de acetonitrilo contendo tampão de acetato de amónio 20 mM (pH 6,5), com a concentração de acetonitrilo a variar linearmente desde 0% até 25% à razão de 0,5%/minuto.

Caudal: 5 mL/minuto.

Temperatura: 50°C.

Detecção: absorção de ultravioletas (220 nm).

Tempo para o fraccionamento:

(1) Fracção B - 41,7 a 43,2 minutos (Val-Thr-Leu)

(2) Fracção A- 45,8 a 51,0 minutos (Val-Tir-Pro).

[Exemplo 4] Quantificação do péptido inibidor da diferenciação dos adipócitos

Quantificou-se a fracção peptídica que possui a actividade inibidora da diferenciação dos adipócitos no proteolisado de globina obtido no exemplo 2, praticando-se para tal o método de purificação dos péptidos disponíveis, enunciado no exemplo 3, com as modificações necessárias.

Hidrólise acídica

Introduziu-se 1 mL de ácido clorídrico, à concentração final de 6N em 3 a 5 mg de proteína, num tubo de ensaio aquecido a 110°C durante 22 horas sob pressão normal no caso do método da ninidrina e sob uma pressão hipobárica no caso da análise dos aminoácidos.

Método da ninidrina

Ajustou-se para 5,0 o valor do pH de uma amostra hidrolisada, por adição de hidróxido de sódio, e deixou-se reagir com o reagente ninidrina que continha tampão de ácido cítrico 0,2 M (pH 5,0) a 100°C durante 15 minutos. Testou-se a solução de reacção resultante para verificar a sua absorvência a 570 nm. Efectuou-se separadamente a reacção com ninidrina em soluções aquosas de L-leucina (nas concentrações de 0,75, 150, 225 e 300 nmol/mL) que serviram de soluções padrão. Desenhou-se uma curva de calibração marcando num gráfico as

absorvências obtidas pela reacção com ninidrina. As quantidades de grupos amino na amostra com L-leucina foram calculadas com base na curva de calibração.

Cartografia dos péptidos

Aparelho: cromatógrafo em fase líquida de elevado rendimento, modelo 'LC-6A', 'Shimadzu Corp.'.

Coluna: 'Shim-pack ISC-07/S1504 Na, 7 μm, 4,0 x 150 mm, 'Shimadzu Corp.'.

Solvente para a eluição: estojo de fase móvel para aminoácidos (forma Na), 'Shimadzu Corp.'.

Caudal: 0,3 mL/minuto.

Temperatura: 55°C.

Solução 1 de reacção: reagente OPA do estojo de análise, 'Shimadzu Corp.'.

Detecção: absorção de fluorescência (Ex 348 nm, Em 450 nm).

Solução padrão

Foram utilizadas soluções padrão de misturas de 18 aminoácidos de forma H (produzidas por 'Wako Pure Chemical Industries Ltd.') que foram diluídas com tampão de ácido cítrico 0,2 M (pH 2,20) até 25 vezes o seu volume original. As soluções diluídas foram injectadas segundo uma dose de 10 μL (contendo 1 nmol de cada aminoácido/10 μL).

Solução de amostra

Concentrou-se até à secura a solução resultante da hidrólise acídica, mediante a utilização de um evaporador rotativo e subsequente secagem sob uma pressão hipobárica durante um período não inferior a 12 horas, até à remoção completa do ácido clorídrico. A

seguir dissolveu-se a amostra anidra em tampão de ácido cítrico 0,2 M (pH 2,20) até o teor em aminoácidos ter diminuído para um nível da ordem de 100 nmol/mL. Obteve-se depois um filtrado através de um filtro com poros com um tamanho de 0,45 μm, o qual foi injectado segundo uma dose de 10 μL. A quantificação dos aminoácidos e o cálculo da área máxima foram efectuados pela análise com um dispositivo 'Chromatopack, C-R4A' (produzido por 'Shimadzu Corp.'). Calculou-se a quantidade de aminoácidos comparando a área máxima da solução de amostra com a área da solução padrão. Calculou-se a composição de aminoácidos determinado as proporções entre as quantidades de aminoácidos e os teores totais em aminoácidos anteriormente determinados.

Os resultados estão indicados sob a forma de rendimentos no quadro 2 apresentado *supra*.

[Exemplo 5] Preparação de H-Val-Thr-Leu-OH por síntese química

Sintetizou-se H-Val-Thr-Leu-OH utilizando um sintetizador de péptidos ('SAM 2', 'Blosearch Corp.'), em conformidade com o correspondente protocolo. Dito de forma concreta, utilizou-se 2 g de resina aciloximetílica, possuidora de 0,3 mmol do terceiro aminoácido protegido (Boc-Leu-OH) que estava ligado, por cada g de resina, tendo sido a resina introduzida no vaso de reacção do sintetizador anteriormente referido e tendo sido desbloqueada com uma solução que continha 45% v/v de ácido trifluoroacético (ATF), 2,5% v/v de anisol e 52,5% v/v de cloreto de metileno (DCM), durante 25 minutos, para se remover o grupo Boc. Enxaguou-se a resina com DCM e depois neutralizou-se com uma solução de DCM contendo 10% v/v de diisopropil-etilenoamina e enxaguou-se novamente com DCM. A seguir fez-se reagir numa solução mista de dimetil-formamida (DMF) e de 20 mL de DCM contendo 4,0 mmol de Boc-Thr-OH e diisopropil-carbodiimida (cada um deles 6,7 vezes equivalente) à temperatura

ambiente durante 2 horas. Seguidamente enxaguou-se sequencialmente com DMF e DCM para se obter uma resina Boc-Thr(Bz)-Leu-PAM.

A seguir acoplou-se a resina a Boc-Val-OH em conformidade com o procedimento descrito antes.

A resina com o péptido protegido, resultante do acoplamento referido antes, reagiu em ácido fluorídrico anidro contendo 10% v/v de anisol a 0°C durante 1 hora, removeu-se o ácido fluorídrico por destilação e enxaguou-se com éter etílico. A partir da mistura obtida de péptido e de resina extraiu-se o péptido com ácido acético a 50%. Liofilizou-se o péptido assim extraído para se obter cerca de 250 mg de péptido impuro.

Dissolveu-se o péptido impuro em 0,1% de água, submeteu-se a uma coluna de sílica octadecílica (SOD, o mesmo que ODS) (Cosmosil 5C18, 250 x 20 mm: Nakaraitesuku Co.) e efectuou-se a eluição com ATF a 0,1%/água em gradiente linear até ATF a 0,1%/acetonitrilo (20% a 70%/50 minutos, 10 mL/minuto). A eluição do péptido desejado ocorreu à concentração aproximada de 50% de acetonitrilo.

[Exemplo 6] Preparação de um alimento que contém o péptido da invenção

(1) <1> Preparou-se um tipo de leite em pó, com possibilidade de inibir a diferenciação dos adipócitos, adicionando 1 g da substância que contém a proteína globina obtida no exemplo 2, a 100 g de leite em pó para crianças.

<2> Preparou-se um tipo de leite em pó, com possibilidade de inibir a diferenciação dos adipócitos, adicionando 0,1 g de H-Val-Thr-Leu-OH, sintetizado no exemplo 5, a 100 g de leite em pó para crianças.

(2) <1> Preparou-se um tipo de chocolate, com possibilidade de inibir a diferenciação dos adipócitos, adicionando 5 g da substância que contém a proteína globina, obtida no exemplo 2, a 100 g de chocolate.

<2> Preparou-se um tipo de chocolate, com possibilidade de inibir a diferenciação dos adipócitos, adicionando 0,5 g de H-Val-Thr-Leu-OH, sintetizado no exemplo 5, a 100 g de chocolate.

[Exemplo 7] Preparação de uma ração que contém o péptido da invenção

Preparou-se uma ração para peixes de piscicultura, com capacidade para inibir a diferenciação dos adipócitos, adicionando separadamente 10% em peso da substância que contém a proteína globina, obtida no exemplo 2, e 1% em peso de H-Val-Thr-Leu-OH, sintetizado no exemplo 5, a 10% em peso de uma mistura prévia que continha vitaminas, sais minerais, etc., e adicionando depois essa mistura prévia, na proporção de 10%, a uma ração de tipo comercial para peixes de pisciculturas.

(Teste 1) Efeito do proteolisado de globina (GD) e da fracção A separada do GD por CLER de fase inversa (figura 2) sobre os preadipócitos (*in vitro*)

(1) Tratamento antes da indução da diferenciação

Com células 3T3-L1 da estirpe de murganho suíço efectuou-se a inoculação, a trabalhar com uma concentração de cerca de $3x10^4$ células/mL, de um prato de cultura de células. Como meio de cultura celular utilizou-se o Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (MEMD) contendo soro fetal de bovino na concentração de 10%. A cultura celular decorreu invariavelmente em atmosfera com 5% de CO_2 e 95% de ar a 37°C.

Depois de se ter formado uma monocamada de células, lavou-se a camada celular com uma solução salina fisiológica tamponada com fosfato (STP). Na presença dos meios de cultura, que continham o GD e a fracção A respectivamente nas concentrações de 0, 2, 4 e 8 mg/mL e nas concentrações de 0, 20, 40 e80μg/mL, criou-se em cultura a camada de células. A seguir lavou-se a superfície da camada de células com STP e criou-se essa camada de células em cultura durante 2 dias na presença de um meio de cultura que continha a substância indutora da diferenciação (0,25μmol de dexametasona, 0,5 mM de 1-metil-3-isobutil-1-xantina e insulina na concentração de 10 μg/mL).

A seguir removeu-se da camada de células o meio de cultura que continha a substância indutora da diferenciação. Lavou-se a superfície da camada de células igualmente com STP e criou-se em cultura a camada de células durante cerca de 1 semana na presença de um meio de cultura que continha insulina numa concentração de 10 μg/mL.

Avaliou-se o efeito da fracção A sobre a diferenciação dos adipócitos, determinando a actividade da enzima glicerol-3-fosfato-desidrogenase (GPDH), enquanto enzima marcadora, em conformidade com um método bem conhecido.

(2) Tratamento após a indução da diferenciação

Criou-se em cultura células 3T3-L1 da estirpe de murganho suíço em conformidade com o mesmo método anteriormente enunciado em (1) e testou-se para pesquisar a actividade da GPDH, adicionando-se esse meio de cultura que continha a insulina na concentração de 10 μg/mL ao GD e à fracção A após a remoção do meio de cultura que continha a substância indutora da diferenciação.

A partir do quadro 3, que mostra os resultados dos testes anteriormente descritos, é claramente evidente que o GD e a fracção A foram habilitados pelo tratamento antes e após a indução da diferenciação a manifestarem uma acção notável de inibição da actividade da GPDH, dependendo isso da concentração do péptido e do facto de esses componentes serem eficazes para inibir a diferenciação dos adipócitos.

Quadro 3. Efeito do GD e da fracção A sobre a diferenciação dos adipócitos (*in vitro*)

Péptido (mg/mL)		Tratamento antes da indução da diferenciação (tratamento de 48 horas antes da indução)		Tratamento após da indução da diferenciação (tratamento de 48 horas após a indução)	
		Actividade da GPDH (mU/mg de proteína)	Inibição (%)	Actividade da GPDH (mU/mg de proteína)	Inibição (%)
GD	0	514,6 ± 95,1	-	747,1 ± 28,9	-
	2	96,1 ± 18,9	81,3	599,6 ± 21,0	19,7
	4	7,8 ±2,8	98,5	343,5 ± 64,4	54,0
	8	6,9 ± 1,9	98,6	16,2 ± 4,4	97,8
Fracção A	0	514,6 ± 95,1	-	747,1 ± 28,9	-
	20	87,3 ± 12,5	83,0	413,7 ± 31,2	44,6
	40	7,8 ± 3,1	98,5	318,5 ± 25,7	57,4
	80	6,7 ± 1,8	98,7	13,6 ±2,7	98,2

[Teste 2] Efeito do péptido (produto de síntese química) inibidor da diferenciação dos adipócitos sobre a inibição da diferenciação dos preadipócitos (*in vitro*)

Em conformidade com o método descrito no exemplo 5 investigou-se os efeitos das substâncias sintetizadas quimicamente H-Val-Thr-Leu-OH e H-Val-Tir-Pro-OH, obtidas pelo mesmo método do exemplo 5, em células 3T3-L1 da estirpe de murganho suíço. As concentrações dos péptidos relevantes nos meios de cultura foram invariavelmente 0, 0,2, 0,4 e 0,8 μg/mL.

O quadro 4, que indica os resultados dos testes anteriormente descritos, permite concluir claramente que as substâncias H-Val-Thr-Leu-OH e H-Val-Tir-Pro-OH foram habilitadas pelo tratamento antes e após a indução da diferenciação a manifestarem uma acção notável de inibição da actividade da GPDH, dependendo isso da concentração do péptido e do facto de esses componentes serem eficazes para inibir a diferenciação dos adipócitos.

Quadro 4. Efeito do GD e da fracção A sobre a diferenciação dos adipócitos (*in vitro*)

Péptido (mg/mL)		Tratamento antes da indução da diferenciação (tratamento de 48 horas antes da indução)		Tratamento após da indução da diferenciação (tratamento de 48 horas após a indução)	
		Actividade da GPDH (mU/mg de proteína)	Inibição (%)	Actividade da GPDH (mU/mg de proteína)	Inibição (%)
(1)*	0	571,3 ± 73,8	-	717,8 ± 45,6	-
	0,2	102,5 ± 19,6	82,1	463,2 ± 29,7	35,5
	0,4	8,1 ± 1,6	98,6	281,1 ± 19,6	60,8
	0,8	6,3 ± 1,9	98,9	13,8 ± 5,4	98,1
(2)*	0	571,3 ± 73,8	-	717,8 ± 45,6	-
	0,2	106,7 ± 28,1	83,0	412,6 ± 20,3	42,5
	0,4	10,6 ± 2,3	98,5	197,3 ± 27,5	72,5
	0,8	7,8 ± 1,5	98,7	14,7 ± 2,7	98,0

* (1): H-Val-Thr-Leu-OH, * (2)H-Val-Tir-Pro-OH

[Teste 3] Efeito do péptido (produto de síntese química) inibidor da diferenciação dos adipócitos (*in vivo*)

Os dois péptidos inibidores da diferenciação dos adipócitos da presente invenção, Val-Thr-Leu e Val-Tir-Pro, sintetizados em conformidade com o método do exemplo 5, foram testados para se pesquisar o seu efeito sobre o aumento do número de adipócitos (*in vivo*). O

teste foi realizado em conformidade com o método descrito a propósito do teste 1 em que se utilizou o proteolisado de globina.

O quadro 5. que agrupa os resultados do teste anteriormente referido, permite concluir claramente que os dois péptidos inibidores da diferenciação, quando acrescentados em quantidades ainda que pequenas, da ordem de 20 ppm, fizeram baixar sempre o número de células no tecido adiposo subcutâneo, no tecido adiposo epididimal e no tecido adiposo retro-peritoneal. Estes resultados são praticamente equivalentes aos resultados obtidos no teste *in vitro* em que foram utilizadas as células 3T3-L1 de murganho.

Quadro 5. Efeito do péptido sintético inibidor da diferenciação dos adipócitos sobre o aumento do número de células no tecido adiposo dos murinos

Tratamento	Tecido adiposo subcutâneo	Tecido adiposo epididimal	Tecido adiposo retroperitoneal
Ração normal	99*	68	20
Ração com 50% de gordura	228	124	41
+ Val-Thr-Leu 20 ppm	102	88	23
+Val-Tir-Pro 20 ppm	125	102	27

* Número de adipócitos (média ± desvio padrão,µg de ADN/tecido adiposo)

[Teste 4] Efeito do proteolisado de globina sobre a diferenciação dos adipócitos (*in vivo*)

Testou-se *in vivo* um protcolisado de globina que continha o péptido da invenção numa quantidade pretendida para pesquisar o seu efeito sobre diversos adipócitos em tecido adiposo.

Ao deixar ratos (machos da espécie Wistar) ingerir livremente, durante 4 semanas, uma ração cujo teor em gordura havia sido aumentado para 10%, que é o nível de um teor em

gordura duplo do existente numa ração normal, por adição de cacau, o número de células no tecido adiposo epididimal passou a ser de 138 x 10^6, representando isto um aumento de 22% comparativamente com o número de 113 x 10^6 existente no grupo de ratos que ingeriram apenas a ração normal (quadro 6). Quando se incorporou na ração cujo teor em gordura era de 10% o referido proteolisado de globina numa concentração de 1% p/p, o número de adipócitos foi reduzido para 119 x10^6 que é um nível praticamente igual ao do número de adipócitos existente nos ratos que ingeriram apenas ração normal. Estes resultados foram obtidos igualmente nas células do tecido adiposo retroperitoneal, sugerindo tal facto que o proteolisado de globina e o proteolisado de glúten de trigo conseguiram suster o aumento do número de adipócitos devido à ingestão excessiva de gordura.

Quadro 6. Efeito do proteolisado sobre o aumento do número de adipócitos nos ratos

Tratamento	Número de adipócitos[1]	Tamanho das células[2]	Peso do tecido[3]
Tecido adiposo epididimal			
Ração normal	113	6,6	5,3
10% de gordura	130	9,6	8,7
+ proteolisado	119	10,4	8,6
Tecido adiposo retroperitoneal			
Ração normal	77	7,2	3,9
10% de gordura	97	9,4	6,4
+ proteolisado	79	11,5	6,4

[1]: x10^6 células/tecido adiposo
[2]: gordura em mg/µg de ADN
[3]: peso do tecido (5)

A seguir deixou-se os murganhos ingerir livremente ração com 50% de gordura, tendo então sido estudados para se pesquisar o peso do tecido adiposo e o número de células. Os resultados obtidos estão agrupados no quadro 7.

A ingestão de ração com 50% de gordura originou invariavelmente um aumento de todos os tecidos adiposos para um nível não inferior ao dobro do nível observado na ingestão de ração normal e observou-se também um aumento proporcional do número de células nos tecidos. Quando se incorporou na ração com 50% de gordura o proteolisado de globina, segundo uma concentração compreendida entre 2% e 12% p/p, foi sustido o aumento de peso e do número de células, dependendo isso da dose.

Quadro 7. Efeito do proteolisado de globina sobre o aumento do tecido adiposo

Tratamento	Tecido adiposo subcutâneo	Tecido adiposo epididimal	Tecido adiposo retroperitoneal
Ração normal	1,16 ± 1,4[1]	0,83 ±0,07	0,22 ±0,03
	105 ± 13[2]	79 ± 13	17 ± 3
com 50% de gordura	3,68 ± 53	2,07 ± 0,24	0,54 ± 0,06
	213 ± 26	134 ± 15	34 ±5
+2% de proteolisado de globina	2,77 ± 0,17	1,72 ±0,09	0,42 ±0,02
	143 ± 6**	106 ± 5	29 ± 1
+4% de proteolisado de globina	2,74 ± 0,27	1,66 ± 0,22	0,45 ± 0,02
	133 ± 14**	98 ± 12	34 ± 4
+8% de proteolisado de globina	2,41 ± 0,18*	1,37 ± 0,08**	0,40 ± 0,06**
	131 ± 8**	95 ± 9**	27 ± 3
+12% de proteolisado de globina	1,96 ±0,10**	1,24 ± 0,11**	0,36 ± 0,03**
	103 ±6***	75 ± 12**	22 ± 2
+ Clenbuterol a 2 ppm	1,49 ± 0,22***	0,97 ±0,11***	0,28 ± 0,04***
	96 ± 8***	79 ± 7***	18 ±2**

1. Linha superior: - peso do tecido adiposo (média ± erro padrão, g)
2. Linha inferior: - número de adipócitos (média ± erro padrão, µg de ADN/tecido adiposo)

Diferença significativa: * p< 10%, ** p < 5%, *** p < 1%

O número de células nos tecidos adiposos, conforme consta do quadro 7, representa os valores em que estão incluídos os adipócitos, os preadipócitos, os fibroblastos, as células dos vasos sanguíneos, etc.. Investigou-se minuciosamente as células no tecido adiposo subcutâneo, classificadas em adipócitos plenamente desenvolvidos (maduros), adipócitos imaturos e células intersticiais (estromas).

Conclui-se com clareza, a partir do quadro 8, onde estão agrupados os resultados do estudo, que foi particularmente sustida a diferenciação de fibroblastos no grupo de células intersticiais, representadas pelos estromas, na passagem a preadipócitos.

Quadro 8. Efeito do proteolisado de globina sobre a distribuição de células do tecido adiposo

Tratamento	Estromas	Preadipócitos	Adipócitos
Ração normal	61	17	27
com 50% de gordura	61	76	76
+2% de proteolisado de globina	37	58	47
+4% de proteolisado de globina	43	48	42
+8% de proteolisado de globina	48	37	47
+12% de proteolisado de globina	41	24	38
+ Clenbuterol a 2 ppm	36	30	30

Estes resultados sugerem que o proteolisado de globina susteve a diferenciação de fibroblastos em células de armazenagem de gordura, tais como os preadipócitos e os adipócitos, e que graças a este efeito é possível concluir que não só o péptido inibidor da diferenciação dos adipócitos mas também o proteolisado de globina são úteis para prevenir e tratar a obesidade e doenças cardiovasculares associadas à obesidade.

[Teste 5] Teste respeitante à segurança do péptido da invenção

Administrou-se por via oral os péptidos da invenção, Val-Tir-Pro e Val-Thr-Leu, segundo uma dose não inferior a 10 g/kg de peso corporal (máxima quantidade ingerível), fazendo variar a razão entre as quantidades dos dois péptidos (0:1, 1:1 e 1:0), a murganhos machos e fêmeas da estirpe ICR. Não morreu nenhum dos animais.

Lisboa, 12 de Março de 2001

P.P. O Agente Oficial da Propriedade Industrial

JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua de Sampaio, 395, r/c-Dto.
1250 LISBOA

Reivindicações

1. Utilização de um tripeptido que possui uma sequência de aminoácidos Val-Tir-Pro ou Val-Thr-Leu para a preparação de um medicamento para tratar ou evitar uma doença em que esteja implicada a diferenciação dos adipócitos.

2. Utilização de um tripeptido que possui uma sequência de aminoácidos Val-Tir-Pro ou Val-Thr-Leu para a preparação de um alimento saudável ou de uma ração para animais para tratar ou evitar uma doença em que esteja implicada a diferenciação dos adipócitos.

3. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 2, em que a doença é a obesidade ou uma doença cardiovascular a ela associada.

4. Utilização de acordo com a reivindicação 3, em que a doença cardiovascular é a hipertensão ou a arteriosclerose.

5. Utilização de um proteolisado que contenha não menos de 0,1% em peso de um tripeptido que possui uma sequência de aminoácidos Val-Tir-Pro ou Val-Thr-Leu para a preparação de um alimento saudável ou de uma ração para animais utilizáveis para tratar ou evitar doenças em que esteja implicada a diferenciação dos adipócitos.

6. Utilização não terapêutica de um tripeptido, tal como especificado na reivindicação 1, ou de um proteolisado, tal como especificado na reivindicação 5, para inibir a diferenciação dos adipócitos.

7. Utilização não terapêutica de um alimento saudável que contenha um tripeptido, tal como especificado na reivindicação 1, ou um proteolisado, tal como especificado na reivindicação 5, para inibir a diferenciação dos adipócitos.

8. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações 2, 5 ou 7, em que o alimento saudável é seleccionado entre leite, pudins, caril, fricassé, guisados, molho de carne, presunto, bolos e chocolates.

9. Método não terapêutico para melhorar a qualidade da carne de um animal doméstico para abate ou de peixes de piscicultura, o qual consiste em alimentar o referido animal ou peixe com uma quantidade eficaz de um tripeptido, tal como definido na reivindicação 1.

10. Utilização não terapêutica de um tripeptido, tal como definido na reivindicação 1, para melhorar a qualidade da carne de um animal doméstico para abate ou de peixes de piscicultura.

11. Método não terapêutico para melhorar a qualidade da carne de um animal doméstico para abate ou de peixes de piscicultura, o qual consiste em alimentar o referido animal ou peixe com uma quantidade eficaz de um proteolisado que contenha não menos de 0,1% em peso de um tripeptido que possua a sequência de aminoácidos Val-Tir-Pro ou Val-Thr-Leu.

12. Utilização não terapêutica de um proteolisado que contenha não menos de 0,1% em peso de um tripeptido que possua uma sequência de aminoácidos Val-Tir-Pro ou Val-Thr-Leu

para melhorar a qualidade da carne de um animal doméstico para abate ou de um peixe de piscicultura.

Lisboa, 12 de Março de 2001

... Oficial de Propriedade Industrial

...SÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
... de Sulfitos, ... Dr.
1250 LISBOA

Resumo

"Péptido inibidor da diferenciação dos adipócitos e inibidor da diferenciação dos adipócitos que contém o referido péptido como ingrediente activo"

A invenção descreve um péptido que possui actividade inibidora da diferenciação dos adipócitos e que tem uma sequência de aminoácidos Val-Tir-Pro ou Val-Thr-Leu e descreve também um inibidor da diferenciação dos adipócitos, um alimento saudável ou uma ração para animais, contendo cada um destes produtos como ingrediente activo o péptido ou um produto de degradação de proteínas que contenha pelo menos 0,1% em peso desse péptido. De acordo com a presente invenção é possível evitar ou tratar a obesidade de seres humanos ou nos animais e as doenças do sistema circulatório a elas associadas, tais como a hipertensão e a arteriosclerose. A invenção refere que também é possível melhorar a qualidade da carne dos animais domésticos para abate ou dos peixes de piscicultura.

Lisboa, 12 de Março de 2001

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.