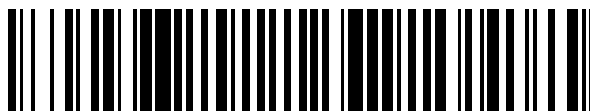


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 308**

51 Int. Cl.:

A61K 38/55 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

C07K 5/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2004 E 08153738 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 1938832**

54 Título: **Péptidos inhibidores de enzima conversora de angiotensina**

30 Prioridad:

18.03.2003 JP 2003074488

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.04.2013

73 Titular/es:

**SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)
1-40, DOJIMAHAMA 2-CHOME, KITA-KU
OSAKA-SHI, OSAKA 530-8203, JP**

72 Inventor/es:

**OGURA, KYOICHI;
IINO, TAEKO y
ASAMI, SUMIO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 400 308 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos inhibidores de enzima conversora de angiotensina

- 5 La presente invención se refiere a un péptido que inhibe la enzima conversora de angiotensina y que es por lo tanto útil como un ingrediente de alimentos sanos y fármacos que tienen un efecto hipotensivo.

10 El número de pacientes con hipertensión, que es un ejemplo típico de enfermedades relacionadas con el estilo de vida, está aumentando cada año. Se sabe que la hipertensión induce diversas complicaciones tales como hemorragia cerebral, hemorragia subaracnoidea, infarto cerebral, infarto de miocardio, angina, nefroesclerosis y así sucesivamente. Por lo tanto, se han realizado diversos estudios sobre el mecanismo de aparición de hipertensión.

15 Como sistemas reguladores de la presión sanguínea, el sistema de renina-angiotensina relacionado con el aumento de la presión sanguínea y el sistema de calicreína-quinina relacionado con la reducción de la presión sanguínea desempeña papeles importantes. En el sistema de renina-angiotensina, el angiotensinógeno secretado del hígado se convierte en angiotensina I por la renina producida en el riñón. La angiotensina I se convierte adicionalmente en angiotensina II por enzima conversora de angiotensina (ACE). La angiotensina II induce la contracción de músculos lisos vasculares y de este modo eleva la presión sanguínea. Por otro lado, la calicreína en el sistema hipotensivo actúa en quininógeno y produce de este modo bradiquinina. La bradiquinina tiene un efecto vasodilatador y reduce la presión sanguínea. Sin embargo, ACE tiene un efecto de degradación de bradiquinina. Es decir, se sabe que ACE
20 participa en el aumento de la presión sanguínea a través de los dos efectos descritos anteriormente, es decir, produciendo angiotensina II que es un péptido vasopresor e inactivando bradiquinina que es un péptido hipotensivo. Por lo tanto, es posible reducir el aumento de la presión sanguínea suprimiendo la actividad enzimática de ACE. Se han empleado ampliamente derivados de prolina tales como captoprilo y enalaprilo desarrollados como inhibidores
25 de ACE, en el tratamiento de hipertensión.

30 En años recientes, se ha indicado que los péptidos obtenidos digiriendo materiales alimentarios con enzimas tienen una actividad inhibidora de ACE. Por ejemplo, se ha presentado un gran número de tales productos de digestión, por ejemplo, un producto de digestión con colagenasa de gelatina (Divulgación Pública de Patente Japonesa SHO 52-148631), un producto de digestión con tripsina de caseína (Divulgación Pública de Patente Japonesa SHO 58-109425, Divulgación Pública de Patente Japonesa SHO 59-44323, Divulgación Pública de Patente Japonesa SHO 60-23086, Divulgación Pública de Patente Japonesa SHO 60-23087, Divulgación Pública de Patente Japonesa SHO 61-36226 y Divulgación Pública de Patente Japonesa SHO 61-36227), un producto de digestión con termolisina de γ -zeína (Divulgación Pública de Patente Japonesa SHO 2-32127), un producto de digestión con pepsina de músculo
35 de sardina (Divulgación Pública de Patente Japonesa HEI 3-11097), un producto de digestión de termolisina de bonito seco (Divulgación Pública de Patente Japonesa HEI 4-144696), un producto de digestión con termolisina de proteína de sésamo (Divulgación Pública de Patente Japonesa de HEI 8-231588), un producto de digestión con pepsina de κ -caseína (Divulgación Pública de Patente Japonesa 8-269088) y similares.

40 Estos péptidos inhibidores de ACE, que son de origen alimentario, tienen ventajas significativas, es decir, presentan pocos problemas de seguridad (es decir, efectos secundarios, toxicidad, etc.) y son comestibles como alimentos habituales. Sin embargo, se ha indicado que los productos peptídicos descritos anteriormente comprenden principalmente péptidos de 5 o más aminoácidos (Divulgación Pública de Patente Japonesa SHO 52-148631, Divulgación Pública de Patente Japonesa SHO 58-109425, Divulgación Pública de Patente Japonesa SHO 59-44323, Publicación de Patente Japonesa SHO 60-23086, Divulgación Pública de Patente Japonesa SHO 61-36226, Divulgación Pública de Patente Japonesa SHO 61-36227, Divulgación Pública de Patente Japonesa HEI 3-11097, Patente Japonesa N° 3135812 y Divulgación Pública de Patente Japonesa HEI 8-269088). Se ha indicado que los péptidos que consistían en cadenas de aminoácidos más largas no podían conseguir un efecto hipertensivo del nivel
45 esperado basándose en la fuerte actividad inhibidora de ACE *in vitro*, probablemente debido a que son susceptibles a digestión por enzimas digestivas en el cuerpo y por lo tanto pierden la actividad inhibidora de ACE o, incluso si permanecen sin digerir, no se absorben fácilmente debido a sus estructuras moleculares voluminosas.
50

55 El documento EP-A-1 092 724 describe una composición inhibidora de ACE que contiene péptidos obtenidos digiriendo una carne de pescado con enzima termolisina.

El documento EP-A-1 018 341 describe tripéptidos inhibidores de ACE obtenidos por tratamiento de un material alimentario como leche, maíz, trigo y soja con bacterias de ácido láctico.

60 El documento EP-A-1 445 606 describe péptidos inhibidores de ACE por tratamiento de un extracto de proteína de maíz con una enzima específica, tal como papaína o termolisina.

65 El documento WO-A-01/68115 describe un proceso para la preparación de péptidos que tienen una actividad inhibidora de ACE. El proceso comprende formar una mezcla homogénea de una fuente de alimento como soja, maíz, trigo y arroz, ajustar el pH y mezclar un agente de escisión selectivo, tal como termolisina.

H. Ohno y K. Mitsutani describen en Gekkan Fudo Kemiraku (Compuestos Químicos Alimentarios), 2002, 18 (3), 11-

15 el efecto antihipertensivo de péptidos del sésamo.

En consecuencia, un objeto de la presente invención es proporcionar un tripéptido inhibidor de ACE que no se digiere fácilmente por enzimas digestivas cuando se toma por vía oral y por lo tanto tiene menor tendencia a perder la actividad inhibidora de ACE *in vivo*.

En la presente invención, también se pretende proporcionar composiciones comestibles (alimento/bebida), inhibidores de enzima convertora de angiotensina y agentes hipotensivos que comprenden el tripéptido descrito anteriormente.

La presente invención se resume por las siguientes realizaciones preferidas:

1. El tripéptido que tiene la secuencia de aminoácidos Val-Ile-Tyr.
2. El tripéptido de acuerdo con el artículo 1 para su uso en la inhibición de enzima convertora de angiotensina (ACE).
3. El tripéptido de acuerdo con el artículo 1 para su uso en un método para prevenir o tratar la hipertensión o suprimir el riesgo de elevación de la presión sanguínea por ingestión oral del péptido.
4. El uso del tripéptido de acuerdo con el artículo 1 en alimentos o bebidas.
5. El uso de acuerdo con el artículo 4 en el que los alimentos o bebidas comprenden de 0,001 a 100 mg de dicho tripéptido en una dosis de consumo única.
6. El tripéptido para su uso de acuerdo con el artículo 2 o 3 en una cantidad de 0,001 a 100 mg en una dosis de consumo único para administración oral.

La Figura 1 es un gráfico que muestra el resultado de un examen sobre el efecto hipotensivo del péptido de acuerdo con la presente invención con el uso de ratas hipotensivas espontáneas.

Los presentes inventores buscaron péptidos inhibidores de ACE que consistían en no más de 3 aminoácidos, asumiendo que los productos de digestión con termolisina de materiales alimentarios contendrían péptidos capaces de superar los problemas anteriormente descritos. Como resultado, consiguieron descubrir 3 tripéptidos en un producto de digestión con termolisina de sésamo, teniendo dichos tripéptidos una actividad inhibidora de ACE y mostrando un efecto hipotensivo en un experimento animal. Estos 3 tripéptidos tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos Leu-Ser-Ala, Val-Ile-Tyr y Leu-Val-Tyr de las que el tripéptido Val-Ile-Tyr es la materia objeto de la presente memoria descriptiva.

La presente invención posibilita además el uso terapéutico y no terapéutico del tripéptido como inhibidor de enzima convertora de angiotensina y agente hipotensivo.

El tripéptido de acuerdo con la presente invención puede producirse por síntesis química. Sin embargo, en una realización de la invención en la que el tripéptido se añade a alimentos, bebidas, o fármacos orales para aprovechar su actividad inhibidora de ACE, se prefiere producir una composición comestible enriquecida con el tripéptido anteriormente descrito digiriendo proteína vegetal que se origina por ejemplo en sésamo con termolisina y purificando adicionalmente la misma.

Como una fuente de proteínas vegetales, se pueden usar tejidos vegetales ricos en proteínas (preferentemente semillas), por ejemplo, cereales tales como arroz, trigo, cebada, avena y maíz, o judías tales como alubia, haba, soja y frijol chino y sésamo.

Cuando el péptido de acuerdo con la invención deba obtenerse por digestión con termolisina, el procedimiento de tratamiento varía dependiendo de las propiedades del material de partida. Se prefiere que, como un pretratamiento, el material primero se desgrase, por ejemplo, retirando el jugo exprimiendo o extrayendo la grasa con un disolvente tal como un alcohol, cetona o hexano. Para mejorar la eficacia de la digestión del material de partida con termólisis, también se prefiere que el material de partida se muele finamente y después se suspenda en agua con agitación. En el caso de una proteína apenas soluble, también es posible emplear otro pretratamiento tal como adición de hidróxido sódico o calentamiento para de este modo disolver uniformemente o suspender la proteína. Después se añade termolisina a la misma en una cantidad apropiada, preferentemente de 500 a 50.000 UP por g de la proteína y la reacción de digestión de la proteína se lleva a cabo a pH 5 a 9, a una temperatura de 10 a 80 °C, durante 0,5 a 48 horas bien en un estado estacionario o bien con agitación. ("UP" significa "unidad de proteasa" y 1 UP se define como la cantidad de una enzima que proporciona un aumento en color de Folin sin proteínas equivalente a 1 µg de tirosina por minuto usando caseína de la leche como el sustrato a pH 7,2 y a 35 °C). Para examinar si se ha producido o no suficiente progreso de la reacción (es decir, la reacción es suficiente para obtener los tripéptidos pretendidos), puede usarse un método que comprende "aplicar la mezcla de reacción líquida a cromatografía líquida de alto rendimiento usando una columna ODS y determinando el patrón de elución midiendo la absorbancia a 210

nm". La reacción se detiene añadiendo, por ejemplo, ácido clorhídrico. Como alternativa, la termolisina puede inactivarse por calentamiento. También es posible detener la reacción tanto añadiendo ácido clorhídrico como calentando. La mezcla de reacción líquida se somete a centrifugación, filtración, etc. y se retira el precipitado. El filtrado obtenido de este modo se neutraliza con hidróxido sódico o ácido clorhídrico y después se concentra.

5 Además, pueden retirarse aromas extraños (por ejemplo, amargor, aspereza, olor desagradable, etc.) si es necesario tratándolo con carbón activado. Los péptidos de sésamo obtenidos de este modo contienen Leu-Ser-Ala, Val-Ile-Tyr y Leu-Val-Tyr cada uno en una cantidad de 0,001% en peso a 0,1% en peso.

10 El producto de digestión con termolisina obtenido de la manera descrita anteriormente puede usarse como la composición de tripéptido de la invención con o sin un tratamiento adicional con una resina de intercambio iónico, una resina polimérica altamente porosa, etc. para retirar proteínas de alto peso molecular, para proporcionar de este modo un producto parcialmente purificado rico en los tripéptidos de la presente invención. Estos productos de digestión y productos parcialmente purificados en general se denominarán en ocasiones en lo sucesivo en este documento "composición rica en tripéptidos". Dicha composición puede tratarse adicionalmente, si es necesario, por
15 carbón activado para retirar aromas extraños (por ejemplo, amargor, aspereza, olor desagradable, etc.) antes de su uso.

20 Para obtener una preparación purificada de los péptidos de la invención, el concentrado descrito anteriormente se somete a cromatografía en columna de filtración en gel, cromatografía con el uso de una resina de intercambio iónico o una resina polimérica altamente porosa, cromatografía de afinidad, etc. y se combinan fracciones peptídicas de la invención que tienen la actividad inhibidora de ACE. A continuación, las fracciones activas combinadas pueden purificarse por un método habitualmente empleado en la purificación de péptidos, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento con el uso de una columna de fase inversa tal como una columna ODS o una columna C30 para proporcionar de este modo formas sencillas de los péptidos en un estado sustancialmente puro. Los tripéptidos de la
25 invención pueden obtenerse no solamente del sésamo (por ejemplo, *Sesamum indicum* L.) sino también de cereales tales como el arroz (por ejemplo, *Oryza sativa* L.), trigo (por ejemplo, *Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf., *T. turgidum* L., *T. pyramidale* (Delile) Perciv. non Delile ex Schult, *T. abyssinicum* Vavilov y *T. carthlicum* Nevski), cebada (por ejemplo, *Hordeum vulgare* L.), avena (por ejemplo, *Avena sativa* L.) o maíz (por ejemplo, *Zea mays* L), o judías tales como alubia (por ejemplo, *Phaseolus vulgaris* L), haba (por ejemplo, *Vicia faba* L), soja (por ejemplo, *Glycine max* (L.) Merrill) o frijol chino (por ejemplo, *Vigna radiata* (L.) R. Wilcz.) por el método descrito anteriormente. La actividad inhibidora de ACE de los tripéptidos o composiciones ricas en tripéptidos puede medirse, por ejemplo, mediante un método de ensayo *in vitro* y/o un método de ensayo *in vivo* como se describirá en los Ejemplos
30 posteriores de este documento.

35 Cuando cada péptido de la invención se prepara por síntesis químicas, la síntesis puede llevarse a cabo por cualquiera del método de fase sólida y el método de fase líquida empleados convencionalmente en la síntesis de un péptido. El péptido de la invención obtenido por la síntesis puede purificarse por un procedimiento de purificación empleado habitualmente, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, cromatografía con el uso de una resina de intercambio iónico o una resina polimérica altamente porosa y cromatografía de afinidad.

40 El tripéptido obtenido de este modo y la composición enriquecida con el tripéptido tienen una fuerte actividad de inhibición de ACE y muestran el fuerte efecto inhibidor de ACE cuando se toman por vía oral. Por lo tanto, son útiles como inhibidores de ACE altamente potentes. Además, se absorben fácilmente por el tracto gastrointestinal y son relativamente estables ante el calor. Debido a estas características, también son aplicables a alimentos, bebidas y preparaciones medicinales en diversas formas.
45

En consecuencia, la presente invención posibilita el uso del tripéptido en una composición comestible que se espera que tenga un efecto inhibidor de enzima conversora de angiotensina.

50 En un caso en el que el tripéptido de la invención se usa en alimentos, bebidas o fármacos puede usarse un tripéptido suficientemente purificado de, por ejemplo, el producto de digestión con termolisina de la fracción proteica del sésamo, o se puede usar un producto sintetizado químicamente. Como alternativa, puesto que el tripéptido de la invención tiene una alta estabilidad y una fuerte actividad inhibidora de ACE, el producto parcialmente purificado descrito anteriormente o el producto de digestión con termolisina o el producto parcialmente purificado del mismo
55 pueden usarse como tales como una composición rica en tripéptidos; en tal caso también se obtendrá una actividad inhibidora de ACE suficiente y por lo tanto esta es una realización preferida de la invención.

60 Se produce una composición comestible añadiendo el tripéptido anteriormente descrito en una cantidad de 0,001 mg a 100 mg, preferiblemente de 0,01 mg a 20 mg y más preferiblemente de 0,1 mg a 10 mg en una dosis de consumo única. El tripéptido de la invención está en forma de un sólido o un polvo que puede manipularse fácilmente y es altamente soluble en agua. Además, el tripéptido puede absorberse bien mediante el tracto gastrointestinal. A continuación, el tripéptido puede añadirse a alimentos en cualquier etapa por cualquier método sin restricción particular. Es decir, el tripéptido puede añadirse, por ejemplo, en forma de un polvo, una solución o una suspensión en la etapa de partida, la etapa intermedia o la etapa final de un proceso de producción de alimentos usando un
65 método habitualmente empleado en el campo de la industria alimentaria. El consumo temporal, intermitente, continuo o diario de la composición comestible que contiene el tripéptido de la invención hace posible inhibir la

enzima convertora de angiotensina y obtener, por ejemplo, un efecto hipotensivo. Los alimentos y bebidas pueden estar en forma de, por ejemplo, un sólido, un semifluido o un fluido. Los ejemplos de alimentos sólidos incluyen alimentos generales y alimentos sanos en forma de galletas, láminas, píldoras tales como comprimidos y cápsulas, gránulos, polvos y así sucesivamente. Los ejemplos de alimentos semifluidos incluyen productos en forma de pastas, gelatinas, geles y así sucesivamente. Los ejemplos de alimentos fluidos incluyen productos de bebidas generales y bebidas sanas en forma de zumos, bebidas frías, té, bebidas tónicas y así sucesivamente. Tales alimentos o bebidas pueden proporcionarse en forma de una bebida de complemento nutricional o un condimento para permitirnos tomar continuamente los tripéptidos de la invención, suprimiendo de este modo el riesgo de aumento de la presión sanguínea.

Una composición medicinal contiene el tripéptido de la invención en una cantidad similar a la composición comestible como se ha descrito anteriormente. La composición medicinal puede administrarse temporalmente a un paciente hipertensivo para suprimir la enzima convertora de angiotensina en el cuerpo y obtener de este modo un efecto hipotensivo. Como alternativa, la composición medicinal puede administrarse continuamente de forma segura, puesto que el principio activo se origina en un material natural. Como ejemplo de las enfermedades que pueden tratarse y/o prevenirse por la composición medicinal puede mencionarse la hipertensión. Es preferible que la composición medicinal esté en forma de una preparación oral tal como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos o jarabes. Los ejemplos de preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones asépticas para administrar por vía intravenosa, vía intraarterial, vía subcutánea, vía intramuscular o vía intranasal. Dicha solución puede estar en forma de un sólido seco que debe disolverse antes de su uso. Puede producirse una preparación de inyección disolviendo una cantidad eficaz del tripéptido en solución salina fisiológica y tratando en condiciones asépticas como se emplean habitualmente en la producción de preparaciones de inyección.

Ejemplos

Ahora se describirá la presente invención en más detalle por referencia a los siguientes Ejemplos.

Método para medir la actividad inhibidora de ACE.

En la presente invención, la actividad inhibidora de ACE (CI_{50}) se midió de acuerdo con el siguiente método.

Tampón: HEPES 0,1 M, NaCl 0,3 M, Triton-X 0,01% (pH 8,3).

Enzima: ACE del pulmón de conejo (Sigma). Disuelta en el tampón anterior y ajustada a una concentración de 1 mU/50 μ l.

Sustrato: Bz-Gly-His-Leu H₂O (Peptide Institute Inc.). Se disolvieron 8,95 mg del sustrato en 1 ml de dimetil sulfóxido y se diluyeron adicionalmente 5 veces con agua (concentración final: 4 mM).

Se pipetearon 5 μ l de una muestra que contenía péptido de la invención en una microplaca de 96 pocillos. Después de añadir 25 μ l del tampón y 10 μ l de la enzima, la mezcla se agitó minuciosamente y se incubó a 37 °C durante 5 minutos. Después de añadir 10 μ l del sustrato, la mezcla se hizo reaccionar a 37 °C durante 30 minutos. Después la reacción se detuvo añadiendo 40 μ l de NaOH 0,1 N. Después de añadir 20 μ l de una solución de metanol de o-ftalaldehído 1% y permitir que se mantuviera a temperatura ambiente durante 10 minutos, se añadieron 100 μ l de HCl 0,1 N y la mezcla resultante se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después se determinó la cantidad de His-Leu formada por la hidrólisis por ACE excitando (a 355 nm) la sustancia fluorescente formada por la reacción entre el grupo amino en el resto de histidina y o-ftalaldehído y midiendo la longitud de onda de fluorescencia a 460 nm. Después se determinó el porcentaje de inhibición por el péptido de la invención de acuerdo con la siguiente ecuación y se calculó la actividad inhibidora de ACE (CI_{50}).

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \{1 - (A - a) / (B - b)\} \times 100$$

A: Medición de fluorescencia cuando se añadió la muestra.

a: Medición de fluorescencia cuando se añadió la muestra y se añadió el tampón como un sustituto de la enzima.

B: Medición de fluorescencia cuando se añadió agua destilada como un sustituto de la muestra.

b: Medición de fluorescencia cuando se añadió agua destilada como un sustituto de la muestra y se añadió el tampón como un sustituto de la enzima.

Ejemplo 1: Producción y purificación de péptido

Se añadieron 2 l de agua a 100 g de sésamo desgrasado y el valor de pH de la mezcla resultante se ajustó a 12,0 a 12,5 añadiendo NaOH. Después de agitar a 55 °C durante 1 hora, la mezcla se filtró para proporcionar un extracto proteico. Se añadió HCl al extracto proteico para ajustar el valor de pH a 4,0. Después de centrifugar se obtuvo la proteína del sésamo (peso seco: 19,8 g).

A 10 g de la proteína de sésamo obtenida, se añadieron 300 ml de agua y se ajustó el valor del pH de la mezcla a

ES 2 400 308 T3

7,5 con NaOH. Después se añadieron 10 mg de termolisina (Nacalai Tesque, 7000 UP/mg) a la misma y la mezcla se hizo reaccionar con agitación suave a 65 °C durante 6 horas. Después de completar la reacción, se añadió HCl a la mezcla de reacción para ajustar a pH 4,0 y la termolisina se inactivó calentando a 90 °C durante 10 minutos. Después de calentar, el precipitado formado de este modo se retiró por centrifugación y el sobrenadante se filtró a través de papel de filtro (Toyo, N° 2). El filtrado se liofilizó para proporcionar 5,9 g de un polvo de péptido.

Se disolvieron 80 mg de este polvo de péptido en 2 ml de solución de etanol al 10% y se sometió a cromatografía en columna de filtración en gel. Las condiciones empleadas fueron las siguientes.

10 Columna: Bio-Gel P-2 (15 mm ID x 820 mm L, Bio-Rad).
 Eluyente: etanol 10%.
 Caudal: 0,15 ml/min.
 Detección: UV 210 nm.

15 El eluato de la columna se recogió en fracciones a intervalos de 15 minutos con el uso de un recolector de fracciones. La actividad inhibitora de ACE de cada fracción se midió de acuerdo con el método descrito anteriormente. Como resultado, la actividad inhibitora de ACE principal en las condiciones anteriores se observó en las fracciones 32 a 38. Estas fracciones se combinaron y se liofilizaron. Este procedimiento se repitió tres veces y se obtuvieron de este modo 37,5 mg de péptidos en total.

20 A continuación, se disolvieron 37,5 mg de los péptidos activos inhibidores de ACE obtenidos por la cromatografía en columna de filtración en gel Bio-Gel P-2 en 2 ml de agua purificada y se sometieron a cromatografía líquida de alto rendimiento con el uso de una columna ODS para fraccionar de este modo los péptidos. Las condiciones empleadas fueron las siguientes:

25 Columna: Develosil ODS-10 (20 mm ID x 250 mm L, Nomura Chemical).
 Fase móvil: Tampón A: CH₃CN 5%, TFA 0,1%, Tampón B: CH₃CN 40%, TFA 0,1 %.
 Gradiente: 0 a 20 minutos: Tampón B 0% 20 a 80 minutos: Tampón B 0 a 100%.
 Caudal: 10 ml/min.
30 Detección: UV 210 nm.

En las condiciones anteriores, el eluato se recogió en fracciones a intervalos de 1 minuto con el uso de un recolector de fracciones. Se pipeteó una parte de 5 µl de cada fracción en una microplaca de 96 pocillos y se evaporó hasta sequedad con presión reducida. A continuación, el resto se disolvió en 5 µl de agua purificada para proporcionar una muestra para medir la actividad inhibitora de ACE. A continuación se midió una actividad inhibitora de ACE de cada fracción de acuerdo con el método descrito anteriormente. Como resultado, las fracciones 39, 52 y 54 mostraron fuertes actividades inhibitoras de ACE. Las tres fracciones se liofilizaron y de este modo se obtuvo una cantidad pequeña de péptidos de cada fracción.

40 Purificación de péptido inhibitor de ACE en la fracción 39.

El péptido liofilizado de la fracción 39 se disolvió en 200 µl de agua purificada y se sometió a cromatografía líquida de alto rendimiento con el uso de una Columna C30 para fraccionar de este modo los péptidos. Las condiciones empleadas fueron las siguientes.

45 Columna: Develosil C30-UG-5 (10 mm ID x 250 mm L, Nomura Chemical).
 Fase móvil: Tampón: CH₃CN 10%, TFA 0,1%.
 Caudal: 4 ml/min.
50 Detección: UV 210 nm.

En las condiciones anteriores, el eluato se recogió en fracciones a intervalos de 15 segundos con el uso de un recolector de fracciones. Se pipeteó una parte de 5 µl de cada fracción en una microplaca de 96 pocillos y se evaporó hasta sequedad con presión reducida. Después, se disolvió el resto en 5 µl de agua purificada para proporcionar una muestra para medir la actividad inhibitora de ACE. Después se midió la actividad inhibitora de ACE de cada fracción de acuerdo con el método descrito anteriormente. Como resultado, las fracciones 44 y 45 mostraron fuertes actividades inhibitoras de ACE. Las dos fracciones se liofilizaron por separado y de este modo se obtuvo una cantidad pequeña de péptidos de cada fracción. A continuación estas fracciones se sometieron a análisis de aminoácidos y análisis de TOF MS/MS. Como resultado, se descubrió que el péptido de las fracciones 44 y 45 era Leu-Ser-Ala.

60 Purificación de péptido inhibitor de ACE en la fracción 52.

El péptido liofilizado de la fracción 52 se disolvió en 200 µl de agua purificada y se sometió a cromatografía líquida de alto rendimiento con el uso de una Columna C30 para fraccionar de este modo los péptidos. Las condiciones empleadas fueron las siguientes.

65

ES 2 400 308 T3

Columna: Develosil C30-UG-5 (10 mm ID x 250 mm L).
Fase móvil: Tampón: CH₃CN 14%, TFA 0,1%.
Caudal: 4 ml/min.
Detección: UV210 nm.

5 En las condiciones anteriores, el eluato se recogió en fracciones a intervalos de 15 segundos con el uso de un recolector de fracciones. Se pipeteó una parte de 5 µl de cada fracción en una microplaca de 96 pocillos y se evaporó hasta sequedad con presión reducida. A continuación, el resto se disolvió en 5 µl de agua purificada para proporcionar una muestra para medir la actividad inhibidora de ACE. A continuación la actividad inhibidora de ACE de cada fracción se midió de acuerdo con el método descrito anteriormente. Como resultado, las fracciones 89 y 90 y las fracciones 96 y 97 mostraron fuertes actividades inhibidoras de ACE. Las cuatro fracciones se liofilizaron por separado y de este modo se obtuvo una cantidad pequeña de péptido de cada fracción. A continuación, estas fracciones se sometieron a análisis de aminoácidos y análisis TOF MS/MS.

15 Como resultado, se descubrió que el péptido de las fracciones 89 y 90 era Ile-Val-Tyr, mientras que el péptido de las fracciones 96 y 97 era Val-Ile-Tyr.

Purificación de péptido inhibidor de ACE en la fracción 54.

20 El péptido liofilizado de la fracción 54 se disolvió en 200 µl de agua purificada y se sometió a cromatografía líquida de alto rendimiento con el uso de una Columna C30 para fraccionar de este modo los péptidos. Las condiciones empleadas fueron las siguientes.

25 Columna: Develosil C30-UG-5 (10 mm ID x 250 mm L, Nomura Chemical).
Fase móvil: Tampón: CH₃CN 17%, TFA 0,1%.
Caudal: 4 ml/min.
Detección: UV 210 nm.

30 En las condiciones anteriores, el eluato se recogió en fracciones a intervalos de 15 segundos con el uso de un recolector de fracciones. Se pipeteó una parte de 5 µl de cada fracción en una microplaca de 96 pocillos y se evaporó hasta sequedad con presión reducida. A continuación, el resto se disolvió en 5 µl de agua purificada para proporcionar una muestra para medir la actividad inhibidora de ACE. Después la actividad inhibidora de ACE de cada fracción se midió de acuerdo con el método descrito anteriormente. Como resultado, las fracciones 69 a 73 mostraron fuertes actividades inhibidoras de ACE. Las cinco fracciones se liofilizaron por separado y de este modo se obtuvo una cantidad pequeña de péptido de cada fracción. A continuación, las fracciones 69, 70, 72 y 73 entre ellas se sometieron a análisis de aminoácidos y análisis de TOF MS/MS. Como resultado, se descubrió que el péptido de cada una de estas fracciones era Leu-Val-Tyr.

40 Ejemplo 2: Producción de péptidos por síntesis química

Usando un sintetizador peptídico automático (Modelo ABI 430) fabricado por Applied Biosystems, se sintetizó una resina peptídica protegida pretendida comenzando con el extremo C terminal y extendiendo la cadena peptídica sucesivamente por el método BOC de acuerdo con el programa.

45 Después de terminar la construcción del péptido en la resina, se secó la resina peptídica protegida. El péptido protegido obtenido de este modo se desprotegió y el péptido se retiró del soporte de resina tratándolo con fluoruro de hidrógeno anhídrido (HF/p-Cresol 8:2 v/v, 60 minutos). El péptido en bruto obtenido de este modo se extrajo con ácido acético 90% y después se liofilizó para proporcionar un sólido en polvo. El péptido en bruto obtenido de este modo se purificó además por cromatografía líquida de alto rendimiento con el uso de una Columna ODS y de este modo se obtuvo el péptido pretendido.

55 Columna: YMC-Pack ODS-2 (30 mm ID x 250 mm L, YMC).
Fase móvil: Tampón A: CH₃CN 5%, TFA 0,1 %. Tampón B: CH₃CN 40%, TFA 0,1 %.
Gradiente: 0 a 10 minutos: Tampón B 0% 10 a 90 minutos: Tampón B 0 a 100%.
Caudal: 20 ml/min.
Detección: UV 220 nm.

60 La pureza del péptido purificado de este modo se examinó por cromatografía líquida de alto rendimiento con el uso de una Columna CDS.

65 Columna: Zorbax 300SB-C18 (4,6 mm ID x 150 mm L, Agilent Technologies).
Fase móvil: Tampón A: CH₃CN 1%, TFA 0,1%. Tampón B: CH₃CN 60%, TFA 0,1%.
Gradiente: 0 a 25 minutos: Tampón B 0 a 100%
Caudal: 1 ml/min.
Detección: UV 220 nm.

Síntesis de Leu-Ser-Ala

5 Usando resina Boc-Ala (BrZ) (0,5 mmol) como el soporte de resina de aminoácidos de partida, la cadena peptídica se extendió con el uso de partes 2 mM de los derivados de aminoácidos Boc-Ser y Boc-Leu. Después se obtuvo Leu-Ser-Ala purificado por el método de purificación descrito anteriormente en el Ejemplo 2. La pureza del producto purificado medida por el método descrito anteriormente en el Ejemplo 2 fue del 99,0%.

Síntesis de Val-Ile-Tyr

10 Usando resina Boc-Tyr (BrZ) (0,5 mmol) como el soporte de resina de aminoácidos de partida, se extendió una cadena peptídica con el uso de partes 2 mM de los derivados de aminoácidos Boc-Ile y Boc-Val. Después se obtuvo Val-Ile-Tyr purificado por el método de purificación descrito anteriormente en el Ejemplo 2. La pureza del producto purificado medida por el método descrito anteriormente en el Ejemplo 2 fue del 98,8%.

15 Síntesis de Leu-Val-Tyr

20 Usando resina Boc-Tyr (BrZ) (0,5 mmol) como el soporte de resina de aminoácidos de partida, se extendió una cadena peptídica con el uso de partes 2 mM de los derivados de aminoácidos Boc-Val y Boc-Leu. Después se obtuvo Leu-Val-Tyr purificado por el método de purificación descrito anteriormente en el Ejemplo 2. La pureza del producto purificado medida por el método descrito anteriormente en el Ejemplo 2 fue del 99,2%.

Ejemplo 3: Medición de la actividad inhibidora de ACE del péptido

25 Las actividades inhibitoras de ACE de los 3 péptidos obtenidos en el Ejemplo 2 se midieron de acuerdo con el método descrito anteriormente y se determinaron los valores de CI_{50} . La tabla 1 muestra los resultados. Como control, se midió también la actividad inhibidora de ACE del polvo de péptido de sésamo obtenido en el Ejemplo 1 y se determinó el valor de CI_{50} del mismo.

Tabla 1

Péptido	Actividad inhibidora (CI_{50})	
	$\mu\text{g/ml}$	μM
Leu-Ser-Ala	2,4	8,4
Val-Ile-Tyr	1,6	4,2
Leu-Val-Tyr	0,84	2,1
Polvo de péptido	-	50,3

Ejemplo 4: Efecto hipotensivo del péptido en rata hipertensiva espontánea

35 Se sometieron a ayunas durante una noche a ratas SHR de 17 a 22 semanas de edad. Después se administraron por vía oral cada uno de los 3 péptidos obtenidos en el Ejemplo 2 en una dosis de 1 mg/kg. A un grupo de control, se le administró por vía oral la misma cantidad de agua para comparación. Antes y hasta 24 horas después de la administración, se midieron los cambios de la presión sanguínea sistólica (BP-98A, SOFTRON). La Figura 1 muestra los resultados.

40 Ejemplo 5

45 Usando los productos sintéticos del Ejemplo 2 se produjo una bebida de té de cereales a partir de los siguientes ingredientes. Composición:

cebada tostada	60 g
agua caliente	2000 ml
Péptidos del Ejemplo 2	
Leu-Ser-Ala	19 mg
Val-Ile-Tyr	18 mg
Leu-Val-Tyr	18 mg

Método de producción:

50 Se añadió agua caliente a cebada tostada y se calentó a 90 °C durante 5 minutos. Después de enfriar a 40 °C, se filtró la mezcla. Después se añadió agua al extracto para ajustar el volumen a 2000 ml. A continuación, se añadieron los péptidos anteriores y se disolvieron agitando para proporcionar una bebida de té de cereales.

Ejemplo 6: Aislamiento y cuantificación de Leu-Val-Tyr de semillas vegetales tratadas con proteinasa

Se pesaron 25 g de granos de arroz y avena respectivamente, que después se molieron para proporcionar polvos. Se añadieron 50 ml de hexano a cada harina y el disolvente se retiró a través de un papel de filtro (Whatman, N° 1). Se repitió el mismo tratamiento con hexano 4 veces en total. Se retiró el hexano del resto en el papel de filtro para proporcionar 18,8 g de un polvo de arroz desgrasado y 15,9 g de un polvo de avena desgrasado, respectivamente.

5 Se pesaron 10 g de cada una de las harinas desgrasadas, se suspendieron en 200 ml de NaOH 0,01 N y se agitó a 55 °C durante 1 hora. Después de enfriar a temperatura ambiente, la suspensión se filtró a través de un papel de filtro (Whatman, N° 1). El filtrado se ajustó a pH 4,0 mediante una adición de HCl 0,1 N. El precipitado formado de este modo se recogió por centrifugación, se liofilizó para producir 0,38 g y 0,57 g de polvos de proteína en bruto de arroz y avena, respectivamente.

15 Se pesaron 0,2 g del polvo obtenido y se suspendieron en 10 ml de CaCl₂ 0,1 mM. La suspensión se ajustó a pH 7,5 y se añadieron 0,2 mg de termolisina (7.000 UP/mg, Nacalai Tesque) a la misma para efectuar la reacción enzimática con agitación suave a 65 °C durante 6 horas. Después del periodo de reacción, el pH se ajustó a 4,0 por HCl 1 N y la termolisina se inactivó calentando la mezcla a 90 °C durante 10 minutos. El precipitado formado por el calentamiento se retiró por centrifugación a 3.000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se liofilizó para proporcionar polvos peptídicos de 28,6 mg de arroz y 87,8 mg de avena.

20 Se llevó a cabo aislamiento y cuantificación de Leu-Val-Tyr, como uno de los péptidos de la invención, de los polvos de péptido del arroz y la avena obtenidos anteriormente como sigue.

i) Pretratamiento en Columna PD-10

25 Se pesaron 20 mg de cada uno de los polvos de péptido de arroz y avena, se disolvieron en ácido acético 0,1 N para ser 5 mg/ml, se filtraron a través de un microfiltro (Millex-HV, tamaño de poro 0,45 µm, diámetro de filtro 13 mm, Millipore Corporation) para retirar componentes insolubles. Se introdujo una parte de 2,5 ml del filtrado en una Columna PD-10 (Columna de desalación, Amersham Biosciences) equilibrada con ácido acético 0,1 N. La columna se lavó con un volumen adicional de 3,5 ml de ácido acético 0,1 N. Después se recogió la fracción eluida con un volumen adicional de 3,0 ml de ácido acético 0,1 N, se evaporó hasta sequedad, se disolvió en 0,5 ml de agua y después se liofilizó.

ii) HPLC de filtración en gel con el uso de TSK-GEL G2000SWXL

35 La muestra de ensayo preparada por el pretratamiento en la Columna PD-10 se disolvió en 250 µl de CH₃CN 45%, TFA 0,1% para centrifugar a 2.000 rpm durante 5 minutos. El filtrado se filtró a través de un microfiltro (Millex-HV, tamaño de poro 0,45 µm, diámetro de filtro 13 mm, Millipore Corporation) para retirar componentes insolubles.

40 Se cargó una parte de 50 µl del filtrado a una columna de TSK-GEL G2000SWXL (7,8 x 300 mm, Tosoh Corporation) equilibrada con CH₃CN 45%, TFA 0,1 %, y se realizó HPLC con CH₃CN 45%, TFA 0,1 % (caudal 0,7 ml/minuto longitud de onda de detección 280 nm). Se recogió el eluato de 1 minuto entre 30 segundos antes y después del tiempo de retención, se evaporó hasta sequedad, se disolvió en 0,5 ml de agua y se liofilizó. El tiempo de retención de Leu-Val-Tyr se predeterminó sometiendo por separado a Leu-Val-Tyr sintético a HPLC en las mismas condiciones.

45 iii) HPLC inversa en Develosil C30-UG-5 (Cuantificación de Leu-Val-Tyr)

50 Leu-Val-Tyr en las fracciones peptídicas activas de la filtración en gel se analizó cuantitativamente por HPLC inversa en una Columna Develosil C30-UG-5 (3 x 150 mm, Nomura Chemical Co., Ltd.). La fracción de la HPLC de filtración en gel en TSK-GEL G2000SWXL se disolvió en 250 µl de CH₃CN 5%, TFA 0,1%, se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se filtró a través de un microfiltro (Millex-HV, tamaño de poro 0,45 µm, diámetro de filtro 13 mm, Millipore Corporation) para retirar componente insolubles. Se cargó una parte de 50 µl del filtrado en una Columna Develosil C30-UG-5 equilibrada con CH₃CN 5 %, TFA 0,1% para realizar una cromatografía en las siguientes condiciones:

Disolvente de elución

0-5 minutos: CH₃CN 5%, TFA 0,1%
 5-10 minutos CH₃CN 5-14%, TFA 0,1%
 10-35 minutos: CH₃CN 14%, TFA 0,1%
 Caudal: 0,4 ml

55

Longitud de onda de detección: 280 nm

60 Se recogió el pico de cada péptido de arroz y avena en la cromatografía en Columna de Develosil C30-UG-5, cuyo tiempo de retención correspondía al del auténtico Leu-Val-Tyr del péptido. La fracción se sometió a un análisis TOF MS y un análisis TOF MS/MS para confirmar que la fracción era Leu-Val-Tyr.

ES 2 400 308 T3

Se preparó una curva de calibración cargando diferentes cantidades del auténtico Leu-Val-Tyr a la misma Columna Develosil C30-UG-5 en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente y representando las áreas pico frente a las cantidades cargadas.

5 Curva de Calibración $Y = 249197X - 2150,6$ ($R^2 = 0,9991$)

Y: área de pico, X: cantidad de Leu-Val-Tyr (μg)

10 Las áreas pico de las fracciones de Leu-Val-Tyr de la cromatografía de Develosil C30-UG-5 de arroz y avena se aplicaron a la curva de calibración. Como resultado, se determinó que las cantidades de Leu-Val-Tyr en 1 mg del péptido de arroz y avena eran $0,71 \mu\text{g}$ y $1,05 \mu\text{g}$, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Un tripéptido que tiene una secuencia de aminoácidos Val-Ile-Tyr.
- 5 2. Un tripéptido que tiene la secuencia de aminoácidos Val-Ile-Tyr para su uso en la inhibición de enzima conversora de angiotensina (ACE).
3. Un tripéptido que tiene la secuencia de aminoácidos Val-Ile-Tyr para su uso en un método para prevenir o tratar hipertensión o suprimir el riesgo de aumento de la presión sanguínea por ingestión oral del péptido.
- 10 4. El uso del tripéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en alimentos o bebidas.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que los alimentos o bebidas comprenden de 0,001 a 100 mg de dicho tripéptido en una dosis de consumo única.
- 15 6. El tripéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 en una cantidad de 0,001 a 100 mg en una dosis de consumo única para administración oral.

Fig. 1

