

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 423 705**

(51) Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
C07K 5/09 (2006.01)
C07K 5/11 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2008 E 08721044 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 2123666**

(54) Título: **Péptidos de caseína para su uso como agentes en patologías hepáticas**

(30) Prioridad:

02.03.2007 JP 2007052520

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

23.09.2013

(73) Titular/es:

MEGMILK SNOW BRAND CO., LTD. (100.0%)
1-1, Naebicho 6-chome, Higashi-ku, Sapporo-shi
Hokkaido 0650043, JP

(72) Inventor/es:

KAWAKAMI, HIROSHI;
KADOOKA, YUKIO;
HOSOYA, TOMOHIRO y
SATO, KENJI

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 423 705 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 de caseína para su uso como agentes en patologías hepáticas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un péptido que tiene un efecto inhibidor de la disfunción hepática. Además, la presente invención se refiere a un péptido que deriva de una proteína de la leche y que tiene un efecto inhibidor de la disfunción hepática. Aún más, la presente invención se refiere a un inhibidor de la disfunción hepática que contiene el péptido como principio activo. Todavía más, la presente invención se refiere a un alimento, bebida o pienso que contiene el péptido. Un inhibidor de la disfunción hepática y un alimento o bebida para inhibir (suprimir) la disfunción hepática de la presente invención son útiles para el tratamiento y la prevención de enfermedades debidas a la disfunción hepática, ya que se pueden ingerir para inhibir (anular) la disfunción hepática tal como la disfunción hepática alcohólica.

15 **Antecedentes técnicos**

El hígado es un órgano importante que es responsable de varias funciones tales como metabolismo y almacenamiento de un hidrato de carbono, una proteína, un lípido, y similares, o degradación y detoxificación de sustancias dañinas. Tales funciones hepáticas padecen disfunción por varios factores tales como infección vírica, agresiones, tabaquismo, hábitos alimenticios poco saludables, y bebida. Como resultado, hay un riesgo aumentado de coger enfermedades tales como hepatitis aguda, hepatitis crónica, hepatitis vírica, esteatosis hepática alcohólica, cirrosis hepática y cáncer de hígado. En particular, el aumento en la cantidad de ingesta de alcohol en el hábito alimenticio aumenta el riesgo de desarrollar disfunción hepática.

25 Se debe indicar que cuando la función hepática padece disfunción debido a varios factores, las enzimas tales como la aspartato aminotransferasa (que también se denomina glutamato oxaloacetato transaminasa, y se abrevia como GOT) y la alanina aminotransferasa (que también se denomina glutamato piruvato transaminasa, y se abrevia como GPT), cada una de las cuales está presente en hepatocitos, se liberan a la sangre, y por tanto, tanto la actividad de GOT en sangre como la actividad de GPT en sangre son indicadores de disfunción hepática.

30 La disfunción hepática se puede tratar con fármacos. Sin embargo, hay un consenso de que la disfunción hepática se debe minimizar deseablemente mediante una acción preventiva. Desde el punto de vista de lo anterior, el medio más adecuado para la acción preventiva es un alimento y un ingrediente alimenticio, cada uno de los cuales se puede ingerir a diario. Por tanto, como alimento para inhibir la disfunción hepática, se conocen cúrcuma, un extracto de ostra, un extracto de hígado, y similares.

35 En los últimos años, se han llevado a cabo extensamente investigaciones sobre la función fisiológica de un alimento y un ingrediente alimenticio. También para el queso, se ha descrito que, a pesar de ser un alimento de alto contenido en grasa, el queso tiene el efecto de fomentar la reducción en la concentración de triglicéridos en sangre y un efecto de mejora del metabolismo del colesterol (documento de patente 1 y documento de patente 2). Además, se ha descrito que el queso también tiene el efecto de inhibición del daño oxidativo causado por el radical de oxígeno, un radical libre, y similares, cada uno de los cuales ejerce un impacto negativo en enfermedades, senescencia, y similares en un cuerpo vivo (documento de patente 3).

40 Documento de patente 1: JP 2003-300890 A
 Documento de patente 2: JP 2003-144090 A
 Documento de patente 3: JP 2004-352958 A.

45 50 El documento EP 12017283 divulga los péptidos de la presente solicitud que tienen las SEQ ID NO: 12 y 15, pero no divulga el uso de dichos péptidos para el tratamiento de una enfermedad que se debe a disfunción hepática en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en hepatitis aguda, hepatitis crónica, hepatitis vírica, esteatosis hepática alcohólica, cirrosis hepática y cáncer de hígado.

55 **Divulgación de la invención**

Problema que se va a resolver por la invención

60 Un objeto de la presente invención es proporcionar un inhibidor de la disfunción hepática o un alimento o bebida para inhibir la disfunción hepática que contengan un péptido contenido en el queso como principio activo, que sea útil para la inhibición de la disfunción hepática mediante su ingestión, y que se pueda ingerir a diario.

Medios para resolver el problema

65 Los inventores de la presente invención han estudiado intensamente para resolver el problema mencionado anteriormente en términos de prevenir y mejorar varias disfunciones en un cuerpo vivo mediante un alimento o un

ingrediente alimenticio que se puede ingerir a diario. Como resultado, los inventores han encontrado que un péptido que incluye cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las siguientes fórmulas (1) a (28) tiene un efecto inhibidor de la disfunción hepática, y tiene el efecto de una dosis menor, y por tanto han completado la presente invención.

- (1) Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu
 - (2) His-Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-Leu-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu
 - (3) Ile-Asn-Pro-Ser-Lys-Glu-Asn
 - (4) Gln-His-Gln-Lys-Ala-Met-Lys-Pro
 - (5) Lys-Phe-Gln-Ser-Glu-Glu-Gln
 - (6) Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe
 - (7) Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala-Pro-Lys-Gln-Lys-Glu-Met
 - (8) Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg
 - (9) piroGlu-Glu-Lys-Asn-Met (piroGlu: piroglutamato)
 - (10) Arg-Pro-Lys-His
 - (11) Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu
 - (12) His-Pro-Ile-Lys
 - (13) His-Pro-Ile-Lys-His-Gln
 - (14) His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro
 - (15) His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln
 - (16) Val-Ala-Pro-Phe-Pro
 - (17) Lys-Val-Asn
 - (18) His-Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr
 - (19) Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-Leu-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu
 - (20) Ile-Asn-Pro-Ser
 - (21) Lys-Phe-Gln-Ser-Glu
 - (22) Phe-Gln-Ser-Glu
 - (23) Phe-Gln-Ser-Glu-Glu-Gln
 - (24) Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val
 - (25) Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro
 - (26) Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met
 - (27) Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala
 - (28) Leu-Leu-Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile

Es decir, la presente invención se refiere a un péptido que tiene un efecto inhibidor de la disfunción hepática, que está representado por cualquiera de las fórmulas anteriores (1) a (28), siempre que la serina (Ser) se pueda fosforilar.

Además, la presente invención se refiere a un péptido que deriva de una proteína de la leche y que tiene un efecto inhibidor de la disfunción hepática, que incluye cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por cualquiera de las fórmulas anteriores (1) a (28).

Aún más, la presente invención se refiere a un inhibidor de la disfunción hepática que contiene un péptido representado por cualquiera de las fórmulas anteriores (1) a (28) como principio activo.

Todavía más, la presente invención se refiere a un alimento, bebida o pienso para inhibir la disfunción hepática que contiene un péptido representado por cualquiera de las fórmulas anteriores (1) a (28).

Efectos de la invención

El péptido que tiene un efecto inhibidor de la disfunción hepática, que incluye cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las fórmulas (1) a (28), de la presente invención se puede ingerir para inhibir (anular) la disfunción hepática, y por tanto es útil para la prevención y mejora de enfermedades tales como hepatitis aguda, hepatitis crónica, hepatitis vírica, esteatosis hepática alcohólica, cirrosis hepática y cáncer de hígado. Por tanto, el péptido se puede usar como un inhibidor de la disfunción hepática que contiene el péptido como un principio activo y un alimento, bebida o pienso para inhibir la disfunción hepática que contiene el péptido.

Breve descripción de las figuras

La [figura 1] es un gráfico que ilustra un valor medio de la actividad de GOT en sangre en cada grupo experimental (ejemplo de referencia 1).

65 La [figura 2] es un gráfico que ilustra un valor medio de la actividad de GPT en sangre en cada grupo experimental (ejemplo de referencia 1).

La [figura 3] es un diagrama que muestra un patrón cromatográfico de una fracción A (ejemplo de prueba 1).

La [figura 4] es un diagrama que muestra un patrón cromatográfico de una fracción B (ejemplo de prueba 1).

5 La [figura 5] es un gráfico que ilustra un valor medio de la actividad de GOT en sangre en cada grupo experimental (ejemplo de prueba 1).

10 La [figura 6] es un gráfico que ilustra un valor medio de la actividad de GPT en sangre en cada grupo experimental (ejemplo de prueba 1).

Mejor modo para llevar a cabo la invención

15 Un péptido que tiene un efecto inhibidor de la disfunción hepática, que incluye cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las fórmulas (1) a (28) que se puede usar en la presente invención se puede obtener mediante, por ejemplo, resuspensión de queso en un solvente, y después de ello desgrasar la suspensión y eliminar la sustancia insoluble por centrifugación. Además, se puede eliminar una proteína de la fracción resultante. En la presente invención, la frase "resuspender queso en un solvente" se refiere a añadir un solvente al queso y homogenizar la mezcla, o aplastar el queso en el solvente, para dar de esta manera el queso que tiene un tamaño 20 que permite que se obtenga fácilmente una fracción peptídica soluble en agua. Como solvente, se puede usar un solvente acuoso tal como agua o un tampón fosfato. Después de eso, se puede llevar a cabo el desalado con una membrana de diáisisis, un resina de intercambio iónico, o similares. Además, se puede realizar un secado tal como liofilización o secado por rociado para formar polvos. Además, también se pueden usar las fracciones obtenidas por purificación de esas fracciones con una membrana de diáisisis y una variedad de cromatografía tal como cromatografía de filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico.

25 Además, como materia prima de queso para obtener el péptido que tiene un efecto inhibidor de la disfunción hepática, que incluye cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las fórmulas (1) a (28), por ejemplo, se puede usar queso natural tal como queso parmesano, queso gruyere, queso marivaux, queso gouda, queso cheddar, queso emmental, queso edam, queso camembert, queso brie, queso munster, queso Pont-L'Évequê, queso stilton, queso danablu o queso azul, y procesar el queso usando el queso natural anteriormente mencionado como materia prima. En particular, se desea usar queso natural muy envejecido.

30 Además, la fracción que contiene un péptido que incluye cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las fórmulas (1) a (28), que se obtiene resuspendiendo el queso en un solvente, y después de ello, desgrasando la suspensión, eliminando una sustancia insoluble y eliminando una proteína sin degradar, se puede purificar adicionalmente por cromatografía de fase reversa usando una columna C18. Cuando la fracción que contiene un péptido se pasa a través de la columna C18 en condiciones ácidas (por ejemplo, ácido trifluoroacético (TFA)) o en condiciones neutras (por ejemplo, agua destilada), las fracciones que tienen un efecto inhibidor de la 35 disfunción hepática principalmente se dividen en una fracción permeable que no se adsorbe a la columna, y una fracción que se adsorbe a la columna y eluye con etanol al 10%. Cuando esas fracciones se purifican adicionalmente por cromatografía de filtración en gel, las fracciones activas tienen una distribución de peso molecular que varía desde 400 a 6.000 en cualquiera de las fracciones.

40 45 Además, la fracción que contiene un péptido se disuelve con TFA al 0,05%, y a continuación se somete a HPLC de fase reversa usando una columna YMC-Pack ODS-A (4,6 mm × 150 mm), para de esta manera fraccionar el péptido. La cromatografía deseablemente se lleva a cabo con las siguientes condiciones: un solvente (solución A: TFA al 0,05%; solución B: acetonaítrilo al 100%); un gradiente de concentración (desde el 0% de B hasta el 45% de B, 125 minutos); una velocidad de flujo: 0,8 ml/min; y una longitud de onda de detección: 220 nm.

50 55 60 A propósito, la madurez (%) que es un indicador del grado al que envejece el queso se calcula con la siguiente ecuación: [(nitrógeno soluble/nitrógeno total) × 100]. La madurez es aproximadamente del 6 al 7% inmediatamente después de la fabricación del queso natural. Sin embargo, en algunos quesos, la madurez aumenta hasta aproximadamente del 24 al 30% junto con el envejecimiento. En la presente invención, se ha confirmado que cuando la madurez se hace más alta según envejece el queso, se obtiene un mayor efecto inhibidor de la disfunción hepática. Esto significa que un componente peptídico eficaz para un efecto inhibidor de la disfunción hepática aumenta según envejece el queso. Por tanto, en la presente invención, se desea usar un componente peptídico que aumenta según el queso envejece, como un componente peptídico contenido en el queso. También se puede usar queso que contiene el mismo esos componentes, o un concentrado de queso que contiene esos componentes peptídicos.

65 Un péptido que tiene un efecto inhibidor de la disfunción hepática que incluye cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las fórmulas (1) a (28) de la presente invención y una fracción que contiene el péptido se pueden administrar por vía oral o por vía parenteral para inhibir (anular) la disfunción hepática o similar en un cuerpo vivo, y por tanto se pueden tratar y prevenir enfermedades hepáticas debidas a la disfunción hepática. En el caso de administrar por vía oral o vía parenteral, como una forma farmacéutica del péptido que tiene efecto

inhibidor de la disfunción hepática de la presente invención, pueden ser formulaciones ejemplificadas tales como comprimidos, cápsulas, gránulos, formulaciones en polvo, polvos, y jarabes. Además, los ejemplos del alimento o bebida para inhibir la disfunción hepática incluyen pan, un aperitivo, chucherías, una tarta, un pudding, una bebida, leche fermentada, fideos, una salchicha y varias dietas de leche en polvo y destete.

5 La dosis oral del péptido que tiene un efecto inhibidor de la disfunción hepática que incluye cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las fórmulas (1) a (28) de la presente invención se puede determinar apropiadamente considerando el fin de tratamiento y prevención, así como los síntomas, peso corporal, edad, sexo, y similares. Generalmente, cuando el péptido que incluye cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las fórmulas (1) a (28) se administra en una cantidad de 10 a 1.000 mg al día para cada ser humano adulto, se obtiene un efecto de tratamiento y prevención de enfermedades debidas a la disfunción hepática. Por tanto, la presente invención tiene un efecto incluso a una dosis menor.

10 15 De aquí en adelante, la invención se explica en más detalle a modo de los ejemplos y ejemplos de prueba. Esos ejemplos son solo ilustrativos y la presente invención no está en modo alguno limitada a los mismos.

Ejemplo 1

(Preparación de péptido a partir de queso de tipo gouda)

20 Se sometió una leche materia prima a esterilización por calor (75°C, 15 segundos) y después se enfrió a 30°C, seguido por la adición de cloruro de calcio al 0,01%. Además, se añadieron el 0,7% de un iniciador de *Lactobacillus* comercialmente disponible (iniciador LD, Chr. Hansen A/S) y el 1% de *Lactobacillus helveticus* (*L. helveticus*) SBT2171 (FERM-14381), que es uno de los lactobacilos productores de polisacáridos, y se añadió además el 0,003% de cuajo para coagular la leche. La cuajada así obtenida se cortó y agitó hasta que el pH llegó de 6,2 a 6,1, seguido por la eliminación del suero, para dar de esta manera gránulos de cuajada. A continuación, los gránulos de cuajada se llenaron en un molde y se apretaron, y además se salaron. Lo resultante se envejeció a 10°C durante 8 meses para preparar queso natural de tipo duro (queso de tipo gouda).

30 A 20 g del queso de tipo gouda preparado se añadieron 80 ml de agua destilada, seguido por molido con Stomacher (ORGANO Corporation) durante 15 minutos. Despues de eso, lo resultante se aplastó adicionalmente con un ultradispersor (ULTRA-TURRAX, T-25; IKA Japón K-K.) en agua durante 30 segundos. La grasa de la leche generada en el momento de la homogenización se retiró. La papilla de queso resultante se agitó con un agitador durante 30 minutos, y después se centrifugó (6.000 rpm, 20 minutos, 4°C) para eliminar materias insolubles, y el sobrenadante se filtró con un papel de filtro (No. 113; Whatman Ltd.). Al filtrado resultante se añadió etanol de modo que se alcanzara una concentración del 70%, y el todo se dejó reposar quieto a 4°C durante 4 horas y después se centrifugó (10.000 rpm, 20 minutos, 4°C) para eliminar materias insolubles. Despues de la eliminación del etanol con un evaporador, se realizó una liofilización para dar una fracción peptídica soluble en agua de queso de tipo gouda.

35 40 45 La fracción peptídica de queso soluble en agua se disolvió en TFA al 0,05%, y después se sometió a HPLC de fase reversa con una columna YMC-Pack ODS-A (4,6 mm × 150 mm) para fraccionar una fracción peptídica purificada soluble en agua. La cromatografía se llevó a cabo con las siguientes condiciones: solvente (solución A: TFA al 0,05%; solución B: acetonitrilo al 100%); gradiente de concentración (desde el 0% de B hasta el 45% de B, 125 minutos); velocidad de flujo: 0,8 ml/min: y longitud de onda de detección: 220 nm.

50 La fracción peptídica purificada soluble en agua se sometió a HPLC de fase reversa usando Cosmosil 5C22-AR-II (4,6 mm × 150 mm) y se fraccionó adicionalmente para dar un péptido. La cromatografía se llevó a cabo con las siguientes condiciones: solvente (solución A: TFA al 0,1%; solución B: acetonitrilo al 80%); gradiente de concentración (desde el 0% de B hasta el 15% de B, 40 minutos); velocidad de flujo: 0,8 ml/min: y longitud de onda de detección: 220 nm.

55 60 Se analizó la secuencia de aminoácidos del péptido así obtenido con un secuenciador de péptidos (Applied Biosystems, Inc.). Se debe indicar que entre los aminoácidos, el piroglutamato generado por la unión intramolecular de un grupo α-amino con un grupo γ-carboxilo en el ácido glutámico se analizó por un método de premarcaje usando 2-nitrofenilhidracina. Los resultados confirmaron un péptido que incluye cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las fórmulas (1) a (28). Cuando se midió un efecto inhibidor de disfunción hepática del péptido resultante por un método según el ejemplo de prueba 1 mencionado posteriormente, se confirmó que tenía un efecto inhibidor de disfunción hepática alto.

65 60 Esos péptidos se observan raramente en queso sin envejecer, pero se generan mediante el envejecimiento. Además, el péptido así obtenido de la presente invención se puede usar directamente como un inhibidor de disfunción hepática.

[Ejemplo de referencia 1]

65 (Confirmación del efecto inhibidor de la disfunción hepática por queso envejecido)

El queso de 5 meses de edad (madurez: 30%) y el queso de 8 meses de edad (madurez: 38%) fabricados en el ejemplo 1 se usaron para el fin de confirmar el efecto de inhibición de la disfunción hepática causada por alcohol. Además, se usó queso sin envejecer como control. Se realizó un experimento en animales dividiendo los animales en un grupo al que se administró queso de 5 meses de edad (grupo de 5 meses de edad) y un grupo al que se le administró queso de 8 meses de edad (grupo de 8 meses de edad), y un grupo al que se le administró queso sin envejecer (grupo sin envejecer), cada uno de los cuales tenía 5 animales.

El experimento en animales se realizó según un método de pienso líquido (Lin, Liquid diet preparation for study of chronic alcohol ingestion in the rat, Lab. Anim. Sci., vol. 39, p. 618-620, 1989). Es decir, se preparó un pienso líquido que contenía el 20% de cada queso, el 8,5% de sacarosa, y el 5% de etanol y se administró a ratones C57BL/6 (5 semanas de edad, machos, Charles river laboratories Japón, Inc.). Una semana después de la administración, las actividades de GOT y GPT, que se liberaron de los hepatocitos que padecían disfunción en la sangre, se midieron con un sistema FUJI DRI-CHEM FDC5500. Se debe indicar que la cantidad de ingestión del pienso líquido fue 8,8 g ± 0,4 g por ratón al día de media, y no hubo diferencia entre los grupos.

Los resultados se muestran en la figura 1 y la figura 2. Los resultados indican que la actividad GOT y la actividad GTP mostraron valores significativamente menores tanto en el grupo de 5 meses de edad como en el grupo de 8 meses de edad, comparados con el grupo sin envejecer. En otras palabras, se encontró que la disfunción hepática se podría reducir por ingestión de un componente peptídico que aumenta según envejece el queso.

[Ejemplo de prueba 1]

(Confirmación del efecto inhibidor de la disfunción hepática usando la fracción peptídica soluble en agua)

La figura 3 y la figura 4 muestran cada una un patrón cromatográfico típico de una fracción obtenida por fraccionamiento adicional de la fracción peptídica soluble en agua en el ejemplo 1. En el ejemplo de prueba 1, una fracción A en la figura 3 y una fracción B en la figura 4 se recogieron cada una para confirmar un efecto de inhibición de la disfunción hepática causada por alcohol en esas fracciones. Mientras tanto, se hizo una confirmación a partir de un análisis de la secuencia de aminoácidos de que la fracción A contiene péptidos que incluyen secuencias de aminoácidos representadas por las fórmulas (10), (11), (15) y (27), y la fracción B contiene péptidos que incluyen secuencias de aminoácidos representadas por las fórmulas (9), (20), (21) y (23).

Se preparó un pienso líquido que contenía el 20% de queso sin envejecer, el 8,5% de sacarosa, el 5% de etanol y el 0,1% de un liofilizado de la fracción A o B para evaluar el grado de disfunción hepática de la misma manera que en el ejemplo de referencia 1.

Los resultados se muestran en las figura 5 y la figura 6. Los resultados indican que un grupo al que se le añadió la fracción mostró valores significativamente menores en la actividad GOT y la actividad GPT, cada una de las cuales era un marcador de disfunción hepática, comparada con un grupo al que no se añadió la fracción.

Está claro del ejemplo de referencia 1 mencionado anteriormente que el queso sin envejecer mostró un efecto inhibidor de la disfunción hepática menor, disfunción que está causada por alcohol, comparado con el queso envejecido. Por otra parte, cuando la fracción que contiene un péptido se añadió al queso sin envejecer, se mostró un efecto inhibidor de la disfunción hepática. Por tanto, se confirmó que la fracción peptídica mostró el efecto inhibidor de la disfunción hepática.

[Ejemplo de prueba 2]

(Medida de la actividad inhibidora de la citotoxicidad celular del péptido)

Se realizó un ensayo para lesión celular con una cepa de hepatocitos humanos (Hep G2, ATCC HB8065) usando el péptido que incluye cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las fórmulas (1) a (28) obtenido en el ejemplo 1. La lesión celular se midió con el aparato "TeraScan VPC, Minerva Tech K.K." que midió la lesión celular por microscopía de fluorescencia. Cuando se permite actuar un compuesto químico que tiene citotoxicidad celular sobre células que se han marcado fluorescentemente de antemano, la membrana celular se destruye y el pigmento fluorescente se libera. Como resultado, después de la lesión celular, solo las células que permanecen sin padecer lesión generan fluorescencia. Basado en el principio mencionado anteriormente, se determinó la diferencia entre la intensidad de la fluorescencia antes de la lesión y la intensidad de la fluorescencia después de la lesión con un dispositivo que mide la lesión celular, y se calcularon las actividades inhibidoras de citotoxicidad celular de varios péptidos. Es decir, se usó peróxido de hidrógeno como el compuesto químico que tiene citotoxicidad celular, y se dejó actuar a una concentración de 58,8 mmol/l en un tampón fosfato (PBS). Se debe indicar que se sabe que el peróxido de hidrógeno una especie molecular típica de radical de oxígeno, mientras que también se sabe que el radical de oxígeno es uno de los factores implicados en el daño hepatocelular en un cuerpo vivo.

Las células se marcaron fluorescentemente con calceína-AM con antelación. Varios péptidos preparados en el ejemplo 2 se añadieron a una microplaca de 96 pocillos que incluían peróxido de hidrógeno y las células, ambos de los cuales se habían dispensado con antelación, seguido por reacción a 37°C durante 100 minutos. Se determinó la relación de descenso en la intensidad de fluorescencia de las células después de la reacción con el dispositivo de medir la lesión celular, y se calculó la proporción (%) de células que padecían lesión. Los resultados se muestran en la tabla 1, como la proporción (%) de células que padecían lesión cuando se añadió el péptido a cada concentración, en donde la proporción (%) de células que padecían lesión sin los péptidos se define como 100.

[Tabla 1]

Proporción (%) de las células que padecían lesión

Péptidos	Concentración de péptido ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	1	10	100	1.000
(1) Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu	100	101	82	65	35
His-Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-					
(2) Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-Leu-Lys-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-	100	98	93	63	31
Gln-Leu					
(3) Ile-Asn-Pro-Ser-Lys-Glu-Asn	100	98	94	64	49
(4) Gln-His-Gln-Lys-Ala-Met-Lys-Pro	100	96	92	70	40
(5) Lys-Phe-Gln-Ser-Glu-Glu-Gln	100	96	85	64	45
(6) Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe	100	98	92	64	34
Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Pro-Pro-Phe-					
(7) Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-Ala-	100	95	92	68	40
Met-Ala-Pro-Lys-Gln-Lys-Glu-Met					
(8) Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg	100	98	85	58	38
(9) piroGlu-Glu-Lys-Asn-Met	100	102	93	59	32
(10) Arg-Pro-Lys-His	100	107	92	61	44
(11) Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu	100	101	79	52	28
(12) His-Pro-Ile-Lys	100	101	95	64	43
(13) His-Pro-Ile-Lys-His-Gln	100	96	89	64	28
(14) His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro	100	106	91	56	31
(15) His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln	100	96	92	58	35
(16) Val-Ala-Pro-Phe-Pro	100	101	82	69	46
(17) Lys-Val-Asn	100	101	81	67	50
(18) His-Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr	100	98	85	56	39
(19) Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-	100	104	91	70	38
Leu-Arg-Leu-Lys-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu					
(20) Ile-Asn-Pro-Ser	100	104	85	68	48
(21) Lys-Phe-Gln-Ser-Glu	100	100	92	64	56
(22) Phe-Gln-Ser-Glu	100	102	88	67	47
(23) Phe-Gln-Ser-Glu-Glu-Gln	100	106	95	60	47
(24) Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val	100	106	87	63	51
(25) Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro	100	99	93	62	48
Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-					
(26) Val-Met	100	107	81	55	38
(27) Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala	100	99	85	70	51
(28) Leu-Leu-Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-	100	97	85	67	46
Phe-Pro-Ile					

Como se muestra en la tabla 1, cuando se añadió cada péptido, la proporción (%) que padeció lesión celular se redujo dependiendo de la concentración del péptido. Por tanto, el resultado de este ejemplo de prueba confirmó que el péptido que incluye cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las fórmulas (1) a (28) tenía una actividad inhibidora del daño hepatocelular, y era útil para la prevención y mejora de una disfunción hepática.

Ejemplo 2

Se mezclaron cada uno de los ingredientes mostrados en la tabla 2 según la composición, se llenó un envase, seguido por esterilización por calor para fabricar una bebida para inhibir la disfunción hepática que contenía el péptido que tiene el efecto inhibidor de la disfunción hepática de la presente invención.

[Tabla 2]

Azúcar isomerizado mezcla	15,4	(% en peso)
Zumo de fruta	10,0	
Ácido cítrico	0,5	
Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu (ejemplo 1)	0,1	
Saborizante	0,2	
Agua	73,8	

5 **Ejemplo 3**

Se preparó una masa que tenía la composición mostrada en la tabla 3, se dio forma y después se horneó para fabricar un bizcocho para inhibir la disfunción hepática que contenía el péptido que tiene el efecto inhibidor de disfunción hepática de la presente invención.

10

[Tabla 3]

Harina de trigo	51,0	(% en peso)
Azúcar	20,0	
Sal de mesa	0,5	
Margarina	12,5	
Huevo	12,5	
Aqua	2,5	
Mezcla mineral	0,8	
Gln-His-Gln-Lys-Ala-Met-Lys-Pro (ejemplo 1)	0,2	

15 **Ejemplo 4**

Se mezclaron cada uno de los ingredientes mostrados en la tabla 4, según la composición, para fabricar una comida para perros que contenía el péptido que tiene el efecto inhibidor de disfunción hepática de la presente invención-

20 [Tabla 4]

Torta de soja	12,0	(% en peso)
Leche desnatada en polvo	14,9	
Aceite de soja	4,0	
Aceite de maíz	2,0	
Aceite de palma	28,0	
Almidón de maíz	15,0	
Harina de trigo	8,0	
Salvado de trigo	2,0	
Mezcla de vitaminas	9,0	
Mezcla de minerales	2,0	
Celulosa	3,0	
piroGlu-Glu-Lys-Asn-Met (ejemplo 1)	0,1	

Lista de secuencias

25

<110> Snow Brand Milk Products Co., Ltd.

<120> Péptidos

30 <160> 28

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

35 <213> Bovino

<400>

Arg Pro Lys His Pro Ile Lys His Gln Gly Leu Pro Gln Glu

1 5 10

<210> 2
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Bovino
 5
 <400>
 His Ile Gln Lys Glu Asp Val Pro Ser Glu Arg Tyr Leu Gly Tyr Leu
 1 5 10 15
 Glu Gln Leu Leu Arg Leu Lys Lys Tyr Lys Val Pro Gln Leu
 20 25

<210> 3
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Bovino

<400>
 Ile Asn Pro Ser Lys Glu Asn
 1 5

15 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Bovino

20 <400>
 Gln His Gln Lys Ala Met Lys Pro
 1 5

25 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Bovino

<400>
 Lys Phe Gln Ser Glu Glu Gln
 1 5

30 <210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 35 <213> Bovino

<400>
 Asp Lys Ile His Pro Phe
 1 5

40 <210> 7
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Bovino

45 <400>
 Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr Pro Val Val Val Pro Pro Phe Leu Gln
 1 5 10 15
 Pro Glu Val Met Gly Val Ser Lys Val Lys Glu Ala Met Ala Pro Lys
 20 25 30
 Gln Lys Glu Met
 35

<210> 8
 <211> 10
 50 <212> PRT
 <213> Bovino

<400>

Tyr Gln Glu Pro Val Leu Gly Pro Val Arg
 1 5 10

5 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Bovino
 <220>
 <221> ÁCIDO PIRROLIDONA CARBOXÍLICO
 <222>
 10 <223>

<400>
 Xaa Glu Lys Asn Met
 1 5

15 <210> 10
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Bovino

20 <400>
 Arg Pro Lys His
 1

<210> 11
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> Bovino

<400>
 Arg Pro Lys His Pro Ile Lys His Gln Gly Leu
 1 5 10

30 <210> 12
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Bovino

35 <400>
 His Pro Ile Lys
 1

<210> 13
 40 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Bovino

<400>
 His Pro Ile Lys His Gln
 1 5

45 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> Bovino

<400>
 His Pro Ile Lys His Gln Gly Leu Pro
 1 5

55 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Bovino

<400>
 His Pro Ile Lys His Gln Gly Leu Pro Gln
 1 5 10

5 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Bovino

<400>
 Val Ala Pro Phe Pro
 1 5

10 <210> 17
 <211> 3
 <212> PRT
 15 <213> Bovino

<400>
 Lys Val Asn
 1

20 <210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Bovino

25 <400>
 His Ile Gln Lys Glu Asp Val Pro Ser Glu Arg Tyr
 1 5 10

<210> 19
 <211> 25
 30 <212> PRT
 <213> Bovino

<400>
 Asp Val Pro Ser Glu Arg Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu Gln Leu Leu Arg
 1 5 10 15
 Leu Lys Lys Tyr Lys Val Pro Gln Leu
 20 25

35 <210> 20
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Bovino

40 <400>
 Ile Asn Pro Ser
 1

<210> 21
 45 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Bovino

<400>
 50 Lys Phe Gln Ser Glu
 1 5

<210> 22
 <211> 4
 55 <212> PRT
 <213> Bovino

<400>

Phe Gln Ser Glu
 1
 <210> 23
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> Bovino
 <400>
 Phe Gln Ser Glu Glu Gln
 1 5
 10 <210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Bovino
 15 <400>
 Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr Pro Val Val Val
 1 5 10
 20 <210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Bovino
 <400>
 Leu Thr Gln Thr Pro Val Val Val Pro Pro Phe Leu Gln Pro
 1 5 10
 25 <210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Bovino
 <400>
 Thr Gln Thr Pro Val Val Val Pro Pro Phe Leu Gln Pro Glu Val Met
 1 5 10 15
 35 <210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Bovino
 40 <400>
 Gly Val Ser Lys Val Lys Glu Ala Met Ala
 1 5 10
 <210> 28
 <211> 17
 45 <212> PRT
 <213> Bovino
 <400>
 Leu Leu Tyr Gln Glu Pro Val Leu Gly Pro Val Arg Gly Pro Phe Pro
 1 5 10 15
 Ile
 50

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las siguientes fórmulas (1) a (28), siempre que la serina (Ser) esté fosforilada:

- 5 (1) Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu
 (2) His-Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-Leu-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu
 10 (3) Ile-Asn-Pro-Ser-Lys-Glu-Asn
 (4) Gln-His-Gln-Lys-Ala-Met-Lys-Pro
 (5) Lys-Phe-Gln-Ser-Glu-Glu-Gln
 (6) Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe
 (7) Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala-Pro-Lys-Gln-Lys-Glu-Met
 15 (8) Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg
 (9) piroGlu-Glu-Lys-Asn-Met (piroGlu: piroglutamato)
 (10) Arg-Pro-Lys-His
 (11) Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu
 (12) His-Pro-Ile-Lys
 20 (13) His-Pro-Ile-Lys-His-Gln
 (14) His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro
 (15) His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln
 (16) Val-Ala-Pro-Phe-Pro
 (17) Lys-Val-Asn
 25 (18) His-Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr
 (19) Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-Leu-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu
 (20) Ile-Asn-Pro-Ser
 (21) Lys-Phe-Gln-Ser-Glu
 30 (22) Phe-Gln-Ser-Glu
 (23) Phe-Gln-Ser-Glu-Glu-Gln
 (24) Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val
 (25) Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro
 (26) Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met
 35 (27) Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala
 (28) Leu-Leu-Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile

para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad debida a disfunción hepática en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en hepatitis aguda, hepatitis crónica, hepatitis vírica, esteatosis hepática alcohólica, cirrosis hepática y cáncer de hígado.

- 40 2. Un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las siguientes fórmulas (1) a (28), siempre que la serina (Ser) esté fosforilada:

- 45 (1) Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu
 (2) His-Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-Leu-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu
 (3) Ile-Asn-Pro-Ser-Lys-Glu-Asn
 (4) Gln-His-Gln-Lys-Ala-Met-Lys-Pro
 50 (5) Lys-Phe-Gln-Ser-Glu-Glu-Gln
 (6) Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe
 (7) Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala-Pro-Lys-Gln-Lys-Glu-Met
 (8) Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg
 55 (9) piroGlu-Glu-Lys-Asn-Met (piroGlu: piroglutamato)
 (10) Arg-Pro-Lys-His
 (11) Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu
 (12) His-Pro-Ile-Lys
 (13) His-Pro-Ile-Lys-His-Gln
 60 (14) His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro
 (15) His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln
 (16) Val-Ala-Pro-Phe-Pro
 (17) Lys-Val-Asn
 (18) His-Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr
 65 (19) Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-Leu-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu

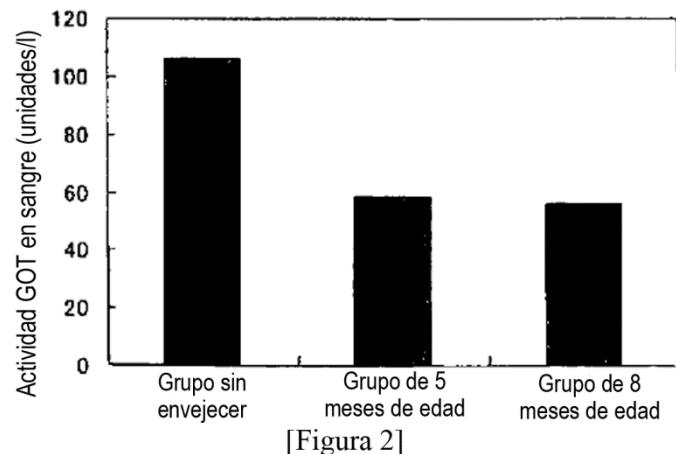
(20) Ile-Asn-Pro-Ser
(21) Lys-Phe-Gln-Ser-Glu
(22) Phe-Gln-Ser-Glu
5 (23) Phe-Gln-Ser-Glu-Glu-Gln
(24) Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val
(25) Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro
(26) Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met
10 (27) Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala
(28) Leu-Leu-Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile

para su uso como un inhibidor de citotoxicidad.

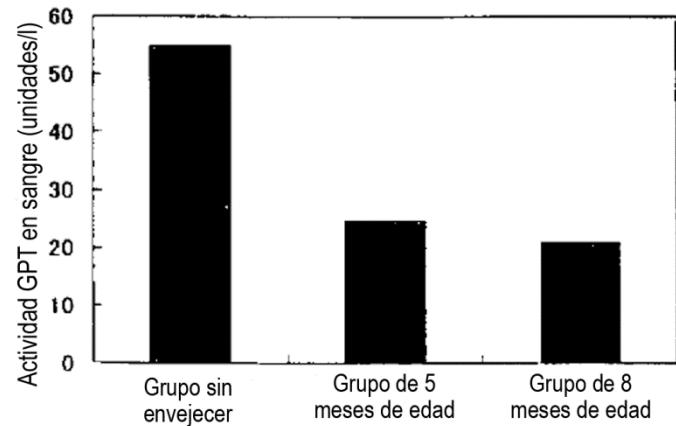
- 15 3. El péptido según la reivindicación 2 en donde el inhibidor de citotoxicidad es un inhibidor de citotoxicidad en hepatocitos.
4. El péptido según la reivindicación 1 o 2, en donde el péptido deriva de proteína de la leche.
5. El péptido según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho péptido está comprendido en un alimento, bebida o pienso.

20

[Figura 1]



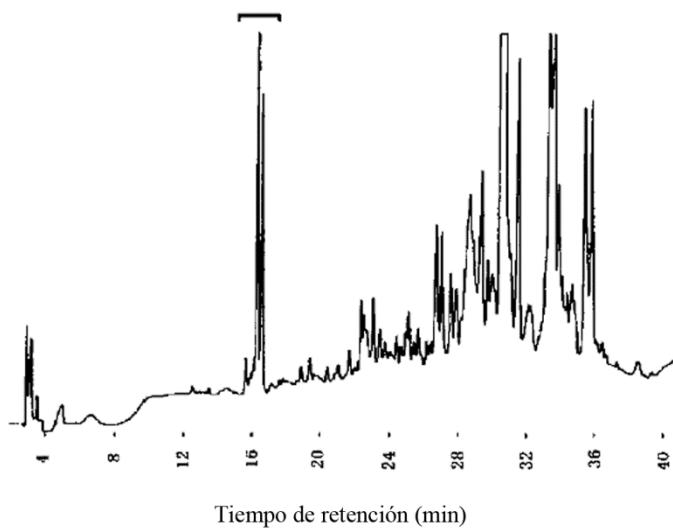
[Figura 2]



ES 2 423 705 T3

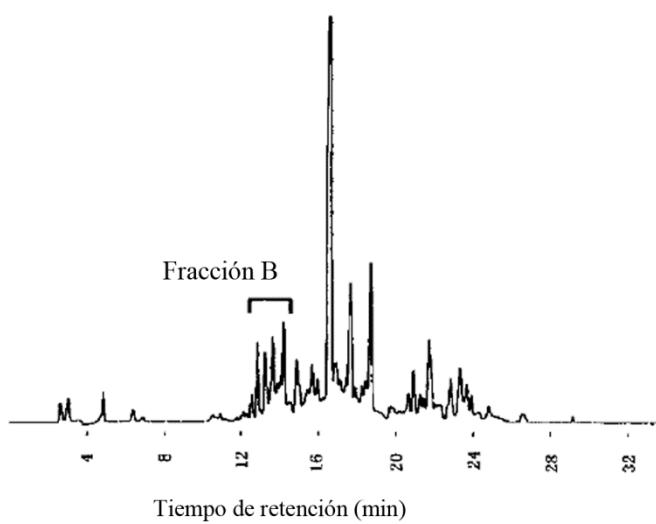
[Figura 3]

Fracción A



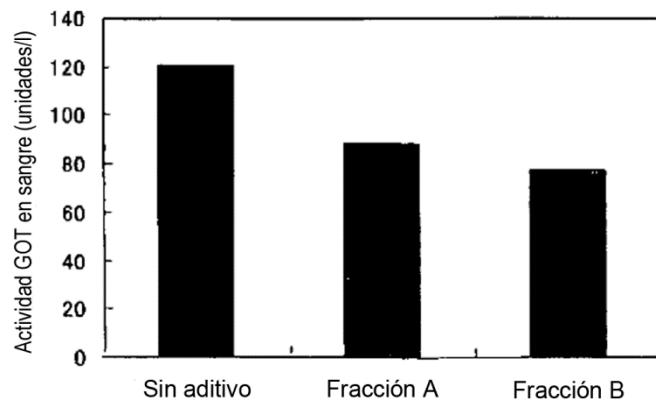
Tiempo de retención (min)

[Figura 4]



Tiempo de retención (min)

[Figura 5]



[Figura 6]

