

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 311**

51 Int. Cl.:

A23J 3/34 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

A23L 1/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2009 E 09797247 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 2384125**

54 Título: **Composiciones de hidrolizado de proteínas con capacidad de liberación de CCK mejorada**

30 Prioridad:

31.12.2008 US 141931 P

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

14.11.2013

73 Titular/es:

**SOLAE, LLC (100.0%)
4300 Duncan Avenue
St. Louis, MO 63110, US**

72 Inventor/es:

**KRUL, ELAINE;
WONG, THEODORE M.;
LOMBARDI, JASON F. y
SCHASTEEN, CHARLES S.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 429 311 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

Composiciones de hidrolizado de proteínas con capacidad de liberación de CCK mejorada

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

5 La presente solicitud reivindica prioridad respecto de la solicitud provisional de Estados Unidos con número 61/141.931, presentada el 31 de Diciembre de 2008, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere, en general, a hidrolizados de proteínas. En particular, los hidrolizados de proteínas generalmente tienen mayor actividad de liberación de colecistoquinina (CCK). Los hidrolizados de proteínas se pueden usar para proporcionar nutrientes y para promover la saciedad.

Antecedentes de la invención

15 Las tasas de obesidad y las enfermedades asociadas con la obesidad están aumentando los Estados Unidos y en todo el mundo. Si bien no existe una única causa subyacente, un factor contribuyente puede ser el estilo de vida apresurado, de ritmo rápido de muchos individuos y además del consumo de comida rápida. La mayor parte de la comida rápida tiende a tener un alto contenido en grasas y/o azúcar.

20 Un objetivo viable para combatir la epidemia de obesidad puede ser la colecistoquinina (CCK). La CCK es una hormona peptídica secretada en la circulación por las células intestinales en respuesta a una proteína o a una comida rica en lípidos. Esta hormona peptídica media varios procesos fisiológicos implicados en la digestión de proteínas y lípidos. La secreción de CCK por la mucosa duodenal e intestinal mucosa se estimula por el quimo rico en grasas o proteínas que entra en el duodeno. La CCK induce, a continuación, la saciedad y la ingesta reducida de alimentos a través de acciones fisiológicas y neuronales directas y/o indirectas. Algunas acciones directas incluyen la inhibición del vaciado gástrico, inhibición de la secreción de ácido gástrico, estimulación de la contracción de la vesícula biliar. En combinación con la capacidad de la CCK para estimular las vías neurales, la liberación de CCK produce una sensación de "saciedad," dando como resultado de este modo, por lo general, el consumo de menos calorías.

25 Cordier-Bussat y col (M. Peptones Stimulate Cholecystokinin Secretion and Gene Transcription in the Intestinal Cell Line STC-1, Endocrinology, vol. 138, nº 3, 1997, páginas 1137-1144) describen los efectos de las peptonas, que constan principalmente de oligopéptidos con un peso molecular inferior a 1200, sobre la CCK en las células STC-1. Estos autores concluyen que las peptonas estimulan específicamente la secreción de CCK y que las peptonas dependientes de la dosis aumentan la actividad transcripcional de un fragmento de 800-bp sobre el promotor del gen de CCK transfectado en las células STC-1.

30 Existe la necesidad, por lo tanto, de un producto alimenticio nutritivo, de fácil acceso que se pueda consumir "sobre la marcha." Este producto alimenticio no sólo debería tener buen sabor, sino que también debería ser saludable desde el punto de vista nutricional; es decir, el producto debería ser bajo en grasas, alto en proteínas, y alto en vitaminas y antioxidantes. Además, también sería altamente beneficioso si el producto alimenticio aumentara la liberación de CCK.

Sumario de la invención

40 Entre los diversos aspectos de la presente invención está un aspecto que incluye una composición de hidrolizado de proteínas que tiene actividad de liberación de colecistoquinina (CCK). La composición de hidrolizado de proteínas comprende una mezcla de fragmentos de polipéptido que tienen un tamaño medio inferior a aproximadamente 100.000 Daltons, comprendiendo dicha mezcla una fracción de polipéptido de 10.000-100.000 Daltons, en la que una fracción soluble de la composición de hidrolizado de proteínas, a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mg/ml, estimula la actividad de liberación de CCK con una potencia básicamente similar a más de un 50 % de la CCK liberada por las células STC-1 estimuladas con 100 nM de 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA) durante 4 horas.

45 Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para aumentar la actividad de liberación de CCK de una célula. El procedimiento comprende poner en contacto la célula con una fracción soluble de una composición de hidrolizado de proteínas. La composición de hidrolizado de proteínas comprende una mezcla de fragmentos de polipéptidos que tienen un tamaño medio inferior a aproximadamente 100.000 Daltons, comprendiendo dicha mezcla una fracción de polipéptidos de 10.000-100.000 Daltons en la que, a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mg/ml, la composición de hidrolizado de proteínas estimula la actividad de liberación de CCK con una potencia básicamente similar a más de un 50 % de la CCK liberada con células STC-1 estimuladas con 100 nM de PMA durante 4 horas.

Un aspecto adicional de la presente invención incluye un procedimiento para promover la saciedad en un sujeto. El

procedimientos comprende administrar al sujeto una cantidad de una composición de hidrolizado de proteínas, en la que la cantidad administrada como resultado una sensación de saciedad por parte del sujeto. La composición de hidrolizado de proteínas comprende una mezcla de fragmentos de polipéptidos que tienen un tamaño medio inferior a aproximadamente 100.000 Daltons, comprendiendo dicha mezcla una fracción de polipéptidos de 10.000-100.000 Daltons en la que, a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mg/ml, la composición de hidrolizado de proteínas estimula la actividad de liberación de CCK con una potencia básicamente similar a más de un 50 % de la CCK liberada con células STC-1 estimuladas con 100 nM de PMA durante 4 horas.

Otro aspecto más de la invención proporciona un producto alimenticio que comprende un material comestible y una fracción soluble de una composición de hidrolizado de proteínas. La composición de hidrolizado de proteínas comprende una mezcla de fragmentos de polipéptidos que tienen un tamaño medio inferior a aproximadamente 100.000 Daltons, comprendiendo dicha mezcla una fracción de polipéptidos de 10.000-100.000 Daltons en la que, a una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mg/ml, la composición de hidrolizado de proteínas estimula la actividad de liberación de CCK con una potencia básicamente similar a más de un 50 % de la CCK liberada con células STC-1 estimuladas con 100 nM of PMA durante 4 horas.

Referencia a las figuras en color.

La solicitud contiene al menos una fotografía realizada en color. Las copias de la presente publicación de solicitud de patente con fotografías en color la proporcionará la Oficina a petición y pago de la tasa necesaria.

Descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra la estimulación de la liberación de CCK por hidrolizados de proteínas de soja y caseinato preparados por digestión de cada uno con pepsina o con pepsina y pancreatina combinadas para imitar la digestión en el estómago y en la parte superior del intestino delgado (duodeno). Los hidrolizados de proteínas se añadieron a los medios de células STC-1 a una concentración de proteínas de aproximadamente 2 mg/ml, y los controles enzimáticos se añadieron a opciones equivalentes de la mezcla de reacción del control (que incluía la enzima o enzimas en ausencia de sustrato de proteínas). Se representa el % de CCK liberada en los medios de células STC-1 estimuladas con los diferentes hidrolizados de proteínas generados por la pepsina o enzimas de pepsina y pancreatina, en comparación con el PMA 100 nM de control (que se estableció como un 100 %). Los medios de cultivo celular solos y 2 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) se usaron como controles de fondo negativos. El control de PMA consistía en PMA 100 nM en medios de cultivo celular que contenían 2 mg/ml de BSA. El % de CCK liberada en los medios de cultivo celular se calculó como sigue a continuación:

$$\% \text{ de liberación de CCK} = \frac{(\text{ng de CCK}_{\text{pocillo de muestra}} - \text{ng de CCK}_{\text{pocillo de control de BSA}})}{(\text{ng de CCK}_{\text{pocillo de PMA}} - \text{ng de CCK}_{\text{pocillo de control de BSA}})} \times 100$$

La digestión de la proteína de soja intacta con pepsina y con pepsina-pancreatina produjo péptidos con actividad de liberación de CCK significativamente más potente que la de la digestión equivalente de proteína de caseinato intacto.

La **Figura 2** presenta una imagen de un gel de poliacrilamida de SDS teñido con Coomassie que contiene fracciones a partir de la filtración de flujo tangencial de un hidrolizado potente de liberación de CCK (SUPRO[®] 950/FXP950). Este hidrolizado se genera por digestión con ALCALASE[®] de Novozymes ((Bagsvaerd, Dinamarca) a un % de grado de hidrólisis de aproximadamente un 9,6 %. Las calles A, B, C, y D representan muestras de 10 µl de suspensiones al 1 % (p/v) de la muestra no fraccionada, mayor que la fracción de 100 kDa, la fracción de 10-100 kDa, y menor que la fracción de 10 kDa, respectivamente. Las calles E y F representan muestras de 10 µl de suspensiones al 5 % (p/v) de la fracción de 10-100 kDa y la fracción de menos de 10 kDa, respectivamente. Los tamaños de los patrones de peso molecular se indican a la izquierda.

La **Figura 3** muestra la estimulación de la liberación de CCK por las preparaciones digeridas con pepsina y pepsina-pancreatina de la fracción de 10-100 kDa de SUPRO[®]950/FXP950, una preparación de proteína hidrolizada que se describe en el Ejemplo 2.

Las **Figuras 4A-H** ilustran la estimulación de la liberación de CCK para diferentes preparaciones de hidrolizado proteína de soja. Se representa el % de CCK liberada en los medios de STC-1 estimulados con los diferentes hidrolizados de proteína de soja generados con las diferentes enzimas tal como se indica en las Figuras 4A-4H y con diferentes % de grados de hidrólisis (% de DH) obtenidos con las diversas condiciones de incubación en comparación con el % de CCK liberada por PMA 100 nM, que se estableció en un 100 %. El % de CCK liberada en los medios de cultivo celular se calcula tal como se describe para la **Figura 1**. PMA induce CCK a través de una estimulación directa de la proteína quinasa C (PKC). Cada hidrolizado de proteína de soja se añadió a células STC-1 a una concentración final de proteínas de aproximadamente 2 mg/ml. La **Figura 4A** muestra la estimulación la liberación de CCK para hidrolizados de proteína de soja tratados con Alcalasa. La **Figura 4B** muestra la estimulación de la liberación de CCK para hidrolizados de proteína de soja tratados con Bromelaína. La **Figura 4C** muestra la estimulación de la liberación de CCK para hidrolizados de proteína de soja tratados con serina proteasa a partir de

Nocardiosis prasina. La **Figura 4D** muestra la estimulación de la liberación de CCK para hidrolizados de proteína de soja tratados con ALCALASE® 2. La **Figura 4E** muestra la estimulación de la liberación de CCK para hidrolizados de proteína de soja tratados con S2. La **Figura 4F** muestra la estimulación de la liberación de CCK para hidrolizados de proteína de soja tratados con MP1. La **Figura 4G** muestra la estimulación de la liberación de CCK para hidrolizados de proteína de soja tratados con TL1. La **Figura 4H** muestra la estimulación de la liberación de CCK para hidrolizados de proteína de soja tratados con ASP-1.

Descripción detallada de la invención

Se sabe que la proteína, en general, estimula la liberación de CCK por las células enteroendocrinas en el tracto intestinal de animales, que incluye los seres humanos (Liddle, R.A., y col., (1986) *Proteins But Not Amino Acids, Carbohydrates, or Fats Stimulate Cholecystokinin Secretion in the Rat*. *Am. J. Physiol.* 251 (Gastrointest. Liver Physiol. 14): G243-G248). Dado que la proteína que pasa al intestino experimenta digestión por enzimas tales como pepsina y una mezcla de enzimas digestivas desde el páncreas (pancreatina), mostramos en la **Figura 1** que una proteína de soja intacta digerida por estas enzimas proporciona péptidos que tienen actividad de liberación de CCK en las células enteroendocrinas. La **Figura 1** también muestra que el caseinato sódico tratado con estas mismas enzimas proporciona péptidos con actividad de liberación de CCK menos potente en comparación con los generados después de la digestión de la proteína de soja intacta. El procedimiento de digestión de la proteína de soja y caseinato, usado para generar los datos en la **Figura 1**, que imitan la digestión del estómago e intestinal superior in vivo, es una modificación de los procedimientos que se han publicado anteriormente de Schasteen (Schasteen, C.S., y col., (2007) *Correlation of an Immobilized Digestive Enzyme Assay With Poultry True Amino Acid Digestibility for Soybean Meal*. *Poultry Science* 86 (2), 343-348) e Higaki (Higaki, N., y col., (2006) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (12), 2844-2852). Las muestras de proteína se solubilizaron en 20 volúmenes de HCl 0,01 M y se digirieron con pepsina (Sigma-Aldrich N° P7012) a una relación de enzima-sustrato de 1:200 (p/p), pH 2,3 y 37 °C durante 4 horas. Después de la digestión de pepsina, se añadió NaOH 2,5 M a la mezcla para ajustar el pH a 8,0, y se añadió pancreatina (Sigma-Aldrich N° P3292) a una relación de 1:200 (p/p) y la digestión se continuó durante otras 4 a 18 horas. El grado de hidrólisis se determinó por la reacción de grupos amina primaria con o-ftalaldehído (OPA) frente a la cantidad total de amina primaria presente en la muestra después de la hidrólisis ácida (110 °C durante 24 horas) (conocida como el "procedimiento OPA"). Los hidrolizados de proteína se añadieron a los medios de células STC-1 a una concentración de proteína de 2 mg/ml, y los controles de enzimas se añadieron a diluciones equivalentes de la mezcla de reacción de control (que incluía la enzima o enzimas en ausencia de sustrato de proteína). Se representa el % de CCK liberada en los medios de células STC-1 estimuladas con las muestras de proteína tratadas con pepsina y pepsina-pancreatina en comparación con la cantidad de CCK liberada por PMA 100 nM de control positivo (que se estableció a un 100 %). El % de CCK liberada en los medios de cultivo celular se calcula como sigue a continuación:

$$\% \text{ de liberación de CCK} = \frac{(\text{ng de CCK}_{\text{pocillo de muestra}} - \text{ng de CCK}_{\text{pocillo de control de BSA}})}{(\text{ng de CCK}_{\text{pocillo de PMA}} - \text{ng de CCK}_{\text{pocillo de control de BSA}})} \times 100$$

Se ha descubierto, tal como se ilustra en los ejemplos, que la digestión enzimática de una proteína en fragmentos de polipéptidos que tienen un tamaño medio inferior a aproximadamente 100.000 Daltons por enzimas que se pueden usar en el procesamiento de ingredientes comerciales como resultado composiciones que tienen mayor actividad de liberación de CCK. Dado que la CCK promueve la saciedad a través del sistema nervioso central, y también ralentiza el vaciado gástrico, las composiciones de hidrolizado de proteínas se pueden incluir en una diversidad de productos alimenticios para promover tanto saciedad como proporcionar nutrientes.

(I) Procedimiento para Preparar un Hidrolizado de Proteínas

Una aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un hidrolizado de proteínas que comprende una mezcla de fragmentos de polipéptidos que tienen un tamaño medio inferior a 100.000 Daltons, comprendiendo dicha mezcla una fracción de polipéptidos de 10.000-100.000 Daltons. El procedimiento comprende poner en contacto un material proteico con una o más enzimas que escinde el material proteico en fragmentos de polipéptidos del tamaño deseado. Los reactivos y los parámetros de reacción se describen con más detalle a continuación.

(a) material proteico

Los ejemplos no limitantes de materiales proteicos adecuados incluyen proteínas vegetales, tales como proteínas de soja o de no soja (por ejemplo, cebada, colza, altramuza, maíz, avena, guisante, patata, arroz, trigo, etc.) y proteínas animales, tales como proteínas de huevo, gelatina, y similares.

En algunas realizaciones, el material proteico puede ser derivado de la soja. Se puede usar una diversidad de materiales de proteína de soja en el procedimiento de la invención para generar un hidrolizado de proteína de soja. En general, el material de proteína de soja puede tener su origen en se puede derivar de semillas de soja enteras de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Las semillas de soja enteras pueden ser de soja convencional

(es decir, semillas de soja no modificadas genéticamente), semillas de soja modificadas genéticamente (tales como, por ejemplo, semillas de soja con aceites modificados, semillas de soja con hidratos de carbono modificados, semillas de soja con subunidades de proteína modificada, etc.) o combinaciones de las mismas. Ejemplos adecuados de material de proteína de soja incluyen extractos de soja, leche de soja, leche de soja en polvo, cuajada de soja, harina de soja, aislado de proteína de soja, concentrado de proteína de soja, proteína de suero de soja, y mezclas de los mismos.

En una realización, el material de proteína de soja usado en el procedimiento puede ser un aislado de proteína de soja (también denominado proteína de soja aislada, o ISP). En general, los aislados de proteína de soja tienen un contenido de proteína de al menos aproximadamente un 90 % de proteína de soja en una base sin humedad. El aislado de proteína de soja puede comprender proteínas de soja intactas o puede comprender proteínas de soja parcialmente hidrolizadas. El aislado de proteína de soja puede tener un contenido elevado de diversas subunidades tales como 7S, 11S, 2S, etc. Los ejemplos no limitantes de aislados de proteína de soja que se pueden usar en la presente invención están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Solae, LLC (St. Louis, MO), e incluyen SUPRO[®] 500E, SUPRO[®] 620, SUPRO[®] 760, SUPRO[®] 670, SUPRO[®] 710, SUPRO[®] EX 33, SUPRO[®] 313.

En otra realización, el material de proteína de soja puede ser un concentrado de proteína de soja, que tiene un contenido de proteína de aproximadamente un 65 % a menos de aproximadamente un 90 % en una base sin humedad. Ejemplos de concentrados de proteína de soja adecuados útiles en la invención incluyen ALPHA[®] DSP-C, Proton[™], ALPHA[®] 12 y ALPHA[®] 5800, que están disponibles en el mercado en Solae, LLC. Como alternativa, el concentrado de proteína de soja se puede mezclar con el aislado de proteína de soja para sustituir una porción f del aislado de proteína de soja como una fuente de material proteico de soja.

En otra realización más, el material de proteína de soja puede ser harina de soja, que en un contenido de proteína de aproximadamente un 49 % a aproximadamente un 65 % en una base sin humedad. La harina de soja puede ser harina de soja desgrasada, harina de soja parcialmente desgrasada, o harina de soja con toda su grasa. La harina de soja se puede mezclar con aislado de proteína de soja o con concentrado de proteína de soja.

Cuando se usa harina de soja, el material de partida es por lo general harina o copos de soja desgrasada. Las semillas de soja con toda su grasa contienen aproximadamente un 40 % de proteína en peso y aproximadamente un 20 % de aceite en peso. Estas semillas de soja con toda su grasa enteras se pueden desgrasar a través de procedimientos convencionales cuando una harina o copos de soja desgrasados forman parte del material proteico de partida. Por ejemplo, la soja se puede limpiar, descascarar, cortar, pasar a través de una serie de rodillos de formación de copos y a continuación se somete a la extracción con disolventes mediante el uso de hexano u otros disolventes apropiados para extraer el aceite y producir "copos consumidos". Los copos desgrasados se pueden moler para producir una harina de soja. Aunque el procedimiento aún está por usar con harina de soja con toda su grasa también puede servir como una fuente de proteína. Sin embargo, cuando se procesa harina de soja con toda su grasa, lo más probable es que sea necesario usar una etapa de separación, tal como una centrifugación en tres etapas para retirar el aceite.

En otra realización alternativa, el material de proteína de soja puede ser proteína de almacenamiento de soja que se ha separado en fracciones principales (15S, 11S, 7S, y 2S) sobre la base de la sedimentación en una centrífuga. En general, la fracción 11S está altamente enriquecida en glicinas, y la fracción 7S está altamente enriquecida en beta-conglicinas.

En otra realización, el material proteico puede tener su origen en una planta distinta a la soja. A modo de ejemplo no limitante, las plantas adecuadas incluyen amaranto, arrurruz, cebada, trigo sarraceno, colza, mandioca, channa (garbanzo), legumbres, lentejas, lupino, maíz, mijo, avena, guisante, patata, arroz, centeno, sorgo, girasol, tapioca, triticale, trigo, y mezclas de los mismos. Las proteínas vegetales especialmente preferentes incluyen cebada, colza, lupino, maíz, avena, guisante, patata, arroz, trigo, y combinaciones de los mismos. En una realización, el material de proteína vegetal puede ser harina de colza, aislado de proteína de colza, concentrado de proteína de colza, o combinaciones de los mismos. En otra realización, el material de proteína vegetal puede ser maíz o proteína de maíz en polvo, maíz o concentrado de proteína de maíz, maíz o aislado de proteína de maíz, maíz o germen de maíz, maíz o gluten de maíz, maíz o harina de gluten de maíz, maíz o harina de maíz, proteína de zeína, o combinaciones de los mismos. En otra realización más, el material de proteína vegetal puede ser cebada en polvo, concentrado de proteína de cebada, aislado de proteína de cebada, harina de cebada, harina fina de cebada, o combinaciones de los mismos. En una realización alternativa, el material de proteína vegetal puede ser harina de lupino, aislado de proteína de lupino, concentrado de proteína de lupino, o combinaciones de los mismos. En otra realización alternativa, el material de proteína vegetal puede ser harina de avena, harina fina de avena, harina de proteína de avena, aislado de proteína de avena, concentrado de proteína de avena, o combinaciones de los mismos. En otra realización más, el material de proteína vegetal puede ser harina de guisante, aislado de proteína de guisante, concentrado de proteína de guisante, o combinaciones de los mismos. En otra realización más, el material de proteína vegetal puede ser proteína de patata en polvo, aislado de proteína de patata, concentrado de proteína de patata, harina de patata, o combinaciones de los mismos. En una realización más, el material de proteína vegetal puede ser harina fina de arroz, harina de arroz, proteína de arroz en polvo, aislado de proteína de arroz, concentrado de proteína de arroz, o combinaciones de los mismos. En otra realización alternativa, el material de proteína vegetal puede ser proteína de trigo en polvo, gluten de trigo, germen de trigo, harina de trigo, aislado de proteína de trigo,

concentrado de proteína de trigo, proteínas de trigo solubilizadas, o combinaciones de los mismos.

En otras realizaciones, el material proteico puede tener su origen en una fuente animal. En una realización, el material proteico animal puede tener su origen en huevos. Los ejemplos no limitantes de proteínas de huevo adecuadas incluyen huevo en polvo, sólidos de huevo seco, proteína de clara de huevo seca, proteína de clara de huevo líquida, proteína de clara de huevo en polvo, proteína de ovoalbúmina aislada, y combinaciones de los mismos. Las proteínas de huevo pueden tener su origen en los huevos de pollo, pato, ganso, codorniz, u otras aves. En una realización alternativa, el material proteico puede tener su origen en una fuente láctea. Proteínas lácteas adecuadas incluyen leche desnatada en polvo, aislado de proteína de leche, concentrado de proteína de leche, caseína ácida, caseinato (por ejemplo, caseinato sódico, caseinato de calcio, y similares), aislado de proteína de suero, concentrado de proteína de suero, y combinaciones de los mismos. El material proteico de leche puede tener su origen en vacas, cabras, ovejas, burros, camellos, camélidos, yaks, búfalos de agua, etc. En una realización más, la proteína puede tener su origen en los músculos, órganos, tejidos conectivos, o esqueletos de animales acuáticos o terrestres. Como un ejemplo, la proteína animal puede ser gelatina, que se produce por la hidrólisis parcial del colágeno extraído de los huesos, tejidos conectivos, órganos, etc, del ganado vacuno u otros animales.

También se contempla que las combinaciones de un material de proteína de soja y al menos otro material proteico también se pueden usar en el procedimiento de la invención. Es decir, una composición de hidrolizado de proteínas se puede preparar a partir de una combinación de un material de proteína de soja y al menos un otro material proteico. En una realización, una composición de hidrolizado de proteínas se puede preparar a partir de una combinación de un material de proteína de soja y un otro material proteico seleccionado entre el grupo que consiste en cebada, colza, lupino, maíz, avena, guisante, patata, arroz, trigo, material animal, productos lácteos, y huevo. En otra realización, una composición de hidrolizado de proteínas se puede preparar a partir de una combinación de un material de proteína de soja y otros dos materiales proteicos seleccionados entre el grupo que consiste en cebada, colza, lupino, maíz, avena, guisante, patata, arroz, trigo, animal material, productos lácteos, y huevo. En otras realizaciones, una composición de hidrolizado de proteínas se puede preparar a partir de una combinación de un material de proteína de soja y tres u otros materiales proteicos más seleccionados entre el grupo que consiste en cebada, colza, lupino, maíz, avena, guisante, patata, arroz, trigo, animal material, productos lácteos, y huevo.

Las concentraciones del material de proteína de soja y el otro material proteico usados en combinación pueden variar y variarán. La cantidad de material de proteína de soja puede variar de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 99 % de la proteína total usada en la combinación. En una realización, la cantidad de material de proteína de soja puede variar de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 % de la proteína total usada en la combinación. En otra realización, la cantidad de material de proteína de soja puede variar de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 40 % de la proteína total usada en la combinación. En otra realización más, la cantidad de material de proteína de soja puede variar de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 80 % de la proteína total usada en la combinación. En una realización más, la cantidad de material de proteína de soja puede variar de aproximadamente un 80 % a aproximadamente un 99 % de la proteína total usada en la combinación. De forma análoga, la cantidad del (al menos uno) otro material proteico puede variar de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 99 % de la proteína total usada en la combinación. En una realización, la cantidad del otro material proteico puede variar de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 % de la proteína total usada en la combinación. En otra realización, la cantidad del otro material proteico puede variar de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 40 % de la proteína total usada en la combinación. En otra realización más, la cantidad del otro material proteico puede variar de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 80 % de la proteína total usada en la combinación. En una realización más, la cantidad de nuestro material proteico puede variar de aproximadamente un 80 % a aproximadamente un 99 % de la proteína total usada en la combinación.

(b) suspensión de proteínas

En el procedimiento de la invención, el material proteico por lo general se mezcla o se dispersa en agua para formar una suspensión que comprende de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 40 % de proteína en peso (en una base "como tal"). En una realización, la suspensión puede comprender de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 % de proteína (como tal) en peso. En otra realización, la suspensión puede comprender de aproximadamente un 6 % a aproximadamente un 10 % de proteína (como tal) en peso. En una realización más, la suspensión puede comprender de aproximadamente un 11 % a aproximadamente un 15 % de proteína (como tal) en peso. En otra realización más, la suspensión puede comprender de aproximadamente un 16 % a aproximadamente un 20 % de proteína (como tal) en peso. En otra realización más, la suspensión puede comprender de aproximadamente un 21 % a aproximadamente un 40 % de proteína (como tal) en peso. El agua puede incluir dispersantes de uso alimentario tales como etanol, glicerol, y similares.

Después de que el material proteico se disperse en agua, la suspensión de material proteico se puede calentar de aproximadamente 70 °C a aproximadamente 90 °C durante aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 20 minutos para inactivar los supuestos inhibidores de proteasa endógenos. Por lo general, el pH y la temperatura de la suspensión de proteína se ajustan para optimizar la reacción de hidrólisis, y en particular, para asegurar que la digestión con enzimas usadas en la reacción de hidrólisis funciona cerca de su nivel de actividad óptima. El pH de la suspensión de proteínas se puede ajustar y controlar de acuerdo con procedimientos conocidos generalmente en la técnica. El pH de la suspensión de proteínas se puede ajustar y mantener de aproximadamente 3,0 a

aproximadamente 11,0. En otras realizaciones, el pH de la suspensión de proteínas se puede ajustar a y mantener de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 4,0, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0, y de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0. En otra realización, el pH de la suspensión de proteínas se puede ajustar y mantener de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 9,0. En una realización alternativa, el pH de la suspensión de proteínas se puede ajustar y mantener de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 10,0, y de aproximadamente 10,0 a aproximadamente 11,0. La temperatura de la suspensión de proteínas se puede ajustar y mantener de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 80 °C durante la reacción de hidrólisis de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica.

(c) digestión enzimática

10 La reacción de hidrólisis se inicia generalmente con la adición de una enzima o una combinación de enzimas a la suspensión de material proteico. Por lo general, la enzima puede ser una enzima de uso alimentario que tiene una actividad óptima a un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 11,0 y a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 80 °C. La enzima puede ser de origen vegetal, animal, o microbiano.

15 La enzima por lo general será una endopeptidasa. Las endopeptidasas actúan preferentemente en las regiones más internas de las cadenas pépticas lejos de los extremos de N y C. Varias endopeptidasas son adecuadas para uso en el procedimiento de la invención. En una realización, la endopeptidasa puede ser serina proteasa de *Nocardia prasina* (SEC ID N°: 2 en la Solicitud Internacional N° WO 2005035747, que se incorpora por referencia en su totalidad). En otra realización, la endopeptidasa puede ser subtilisina proteasa de *Bacillus licheniformis*, que está disponible como ALCALASE® en Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). En otra realización más, la endopeptidasa puede ser serina proteasa también denominada glutamil endopeptidasa (denominada "GE") de *Bacillus licheniformis* (UNIPROT: P80057 tal como se desvela y se caracteriza en las Patentes de Estados Unidos N° 4.266.031, N° 5.874.278, y N° 5.459.064 y en las Solicitudes Internacionales con N° WO 01/16285, N° WO 92/13964, N° WO 91/13553, y N° WO 91/13554, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad). En otra realización más, la endopeptidasa puede ser proteasa de tipo tripsina (denominada "TL1") de *Fusarium oxysporum* (SWISSPROT N° P35049) (Patentes de Estados Unidos N° 5.288.627 y N° 5.693.520 cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). En una realización alternativa, la endopeptidasa puede ser lisil endopeptidasa (denominada "LE") de *Achromobacter lyticus* (UN-IPROT: P15636). En una realización más, la endopeptidasa puede ser una forma más purificada de subtilisina proteasa de *Bacillus licheniformis* (denominada "Alcalase® 2"). En otras realizaciones más, la endopeptidasa puede ser una proteasa de tipo tripsina de *Fusarium solani* (GENESEQP: ADZ80577). Las enzimas adecuadas incluyen adicionalmente subtilisina proteasa 2 (S2), metalo proteasa 1 (MP1), y aspartato proteasa 1 (ASP-1). Otras enzimas adecuadas incluyen bromelaína, subtilisina, quimotripsina, tripsina, pepsina, y elastasa. En algunas realizaciones, se puede usar una combinación de endopeptidasas.

25 En una realización más, la endopeptidasa se puede combinar con al menos una exopeptidasa. Generalmente, las exopeptidasas actúan solamente cerca de los extremos de las cadenas pépticas en los extremos de N o C. las que actúan en un extremo N libre liberan un único resto de aminoácido (es decir, aminopeptidasas), un dipéptido (es decir, dipeptidil-peptidasas) o un tripéptido (es decir, tripeptidil-peptidasas). Las exopeptidasas que actúan en un extremo C libre liberan un único aminoácido (es decir, carboxipeptidasas) o un dipéptido (es decir, peptidildipeptidasas). Algunas exopeptidasas son específicas para dipéptidos (es decir, dipeptidasas) o retiran restos terminales que están sustituidos, ciclados o unidos por enlaces isopeptídicos. Los enlaces isopeptídicos son uniones pépticas distintas a las de un grupo carboxilo a un grupo α -amino, y este grupo de enzimas se caracteriza por peptidasas omega.

35 Los ejemplos no limitantes de exopeptidasas adecuadas para uso en el procedimiento de la invención incluyen carboxipeptidasa D de *Aspergillus oryzae* (UNIPROT: Q2TZ11), carboxipeptidasa Y de *Aspergillus oryzae* (UNIPROT: Q2TYA1), aminopeptidasa de *Aspergillus oryzae* (Solicitud Internacional N° WO 96/28542, que se incorpora por referencia en su totalidad), y aminopeptidasa de *Bacillus licheniformis* (UNIPROT: Q65DH7).

45 La cantidad de enzima añadida al material proteico puede variar y variará, dependiendo del grado deseado de hidrólisis y la duración de la reacción de hidrólisis. La cantidad puede variar de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5000 mg de proteína enzimática por kilogramo de material proteico. En otra realización, la cantidad puede variar de 10 mg a aproximadamente 2000 mg de proteína enzimática por kilogramo de material proteico. En otra realización más, la cantidad puede variar de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 1000 mg de proteína enzimática por kilogramo de material proteico.

50 Como apreciará un experto en la materia, la duración de la reacción de hidrólisis puede variar y variará dependiendo de la enzima, el material proteico, y el grado deseado de hidrólisis. Hablando en términos generales, la duración de la reacción de hidrólisis puede variar de unos pocos minutos a muchas horas, tal como, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas. Para finalizar la reacción de hidrólisis, la composición se puede calentar a una temperatura que sea lo suficientemente elevada como para inactivar la enzima. Por ejemplo, el calentamiento de la composición a una temperatura de aproximadamente 90 °C básicamente inactivará por calor a la mayoría de las enzimas. Otros procedimientos de inactivación incluyen enfriamiento por debajo de 10 °C y/o disminución del pH por debajo de aproximadamente 3,0, dependiendo de la enzima usada.

ES 2 429 311 T3

Diversas combinaciones de material proteico y enzima se presentan en la Tabla A.

Tabla A. Combinaciones Preferentes.

Material Proteico	Endopeptidasa
Soja	Serina proteasa
Soja	ALCALASE [®]
Soja	GE
Soja	TL1
Soja	LE
Soja	Bromelaína
Soja	Alcalase [®] 2
Soja	S2
Soja	MP1
Soja	ASP-1
Cebada	Serina proteasa
Cebada	ALCALASE [®]
Cebada	GE
Cebada	TL1
Cebada	LE
Cebada	Bromelaína
Cebada	Alcalase [®] 2
Cebada	S2
Cebada	MP1
Cebada	ASP-1
Colza	Serina proteasa
Colza	ALCALASE [®]
Colza	GE
Colza	TL1
Colza	LE
Colza	Bromelaína
Colza	Alcalase [®] 2
Colza	S2
Colza	MP1
Colza	ASP-1
Lupino	Serina proteasa
Lupino	ALCALASE [®]
Lupino	GE
Lupino	TL1
Lupino	LE
Lupino	Bromelaína
Lupino	Alcalase [®] 2
Lupino	S2

ES 2 429 311 T3

(continuación)

Material Proteico	Endopeptidasa
Lupino	MP1
Lupino	ASP-1
Maíz	Serina proteasa
Maíz	ALCALASE [®]
Maíz	GE
Maíz	TL1
Maíz	LE
Maíz	Bromelaína
Maíz	Alcalase [®] 2
Maíz	S2
Maíz	MP1
Maíz	ASP-1
Avena	Serina proteasa
Avena	ALCALASE [®]
Avena	GE
Avena	TL1
Avena	LE
Avena	Bromelaína
Avena	Alcalase [®] 2
Avena	S2
Avena	MP1
Avena	ASP-1
Guisante	Serina proteasa
Guisante	ALCALASE [®]
Guisante	GE
Guisante	TL1
Guisante	LE
Guisante	Bromelaína
Guisante	Alcalase [®] 2
Guisante	S2
Guisante	MP1
Guisante	ASP-1
Patata	Serina proteasa
Patata	ALCALASE [®]
Patata	GE
Patata	TL1
Patata	LE
Patata	Bromelaína
Patata	Alcalase [®] 2

ES 2 429 311 T3

(continuación)

Material Proteico	Endopeptidasa
Patata	S2
Patata	MP1
Patata	ASP-1
Arroz	Serina proteasa
Arroz	ALCALASE [®]
Arroz	GE
Arroz	TL1
Arroz	LE
Arroz	Bromelaína
Arroz	Alcalase [®] 2
Arroz	S2
Arroz	MP1
Arroz	ASP-1
Trigo	Serina proteasa
Trigo	ALCALASE [®]
Trigo	GE
Trigo	TL1
Trigo	LE
Trigo	Bromelaína
Trigo	Alcalase [®] 2
Trigo	S2
Trigo	MP1
Trigo	ASP-1
Huevo	Serina proteasa
Huevo	ALCALASE [®]
Huevo	GE
Huevo	TL1
Huevo	LE
Huevo	Bromelaína
Huevo	Alcalase [®] 2
Huevo	S2
Huevo	MP1
Huevo	ASP-1
Productos Lácteos	Serina proteasa
Productos Lácteos	ALCALASE [®]
Productos Lácteos	GE
Productos Lácteos	TL1
Productos Lácteos	LE
Productos Lácteos	Bromelaína

ES 2 429 311 T3

(continuación)

Material Proteico	Endopeptidasa
Productos Lácteos	Alcalase [®] 2
Productos Lácteos	S2
Productos Lácteos	MP1
Productos Lácteos	ASP-1
Animal	Serina proteasa
Animal	ALCALASE [®]
Animal	GE
Animal	TL1
Animal	LE
Animal	Bromelaína
Animal	Alcalase [®] 2
Animal	S2
Animal	MP1
Animal	ASP-1
Soja y Cebada	Serina proteasa
Soja y Cebada	ALCALASE [®]
Soja y Cebada	GE
Soja y Cebada	TL1
Soja y Cebada	LE
Soja y Cebada	Bromelaína
Soja y Cebada	Alcalase [®] 2
Soja y Cebada	S2
Soja y Cebada	MP1
Soja y Cebada	ASP-1
Soja y Colza	Serina proteasa
Soja y Colza	ALCALASE [®]
Soja y Colza	GE
Soja y Colza	TL1
Soja y Colza	LE
Soja y Colza	Bromelaína
Soja y Colza	Alcalase [®] 2
Soja y Colza	S2
Soja y Colza	MP1
Soja y Colza	ASP-1
Soja y Lupino	Serina proteasa
Soja y Lupino	ALCALASE [®]
Soja y Lupino	GE
Soja y Lupino	TL1
Soja y Lupino	LE

ES 2 429 311 T3

(continuación)

Material Proteico	Endopeptidasa
Soja y Lupino	Bromelaína
Soja y Lupino	Alcalase [®] 2
Soja y Lupino	S2
Soja y Lupino	MP1
Soja y Lupino	ASP-1
Soja y Maíz	Serina proteasa
Soja y Maíz	ALCALASE [®]
Soja y Maíz	GE
Soja y Maíz	TL1
Soja y Maíz	LE
Soja y Maíz	Bromelaína
Soja y Maíz	Alcalase [®] 2
Soja y Maíz	S2
Soja y Maíz	MP1
Soja y Maíz	ASP-1
Soja y Avena	Serina proteasa
Soja y Avena	ALCALASE [®]
Soja y Avena	GE
Soja y Avena	TL1
Soja y Avena	LE
Soja y Avena	Bromelaína
Soja y Avena	Alcalase [®] 2
Soja y Avena	S2
Soja y Avena	MP1
Soja y Avena	ASP-1
Soja y Guisante	Serina proteasa
Soja y Guisante	ALCALASE [®]
Soja y Guisante	GE
Soja y Guisante	TL1
Soja y Guisante	LE
Soja y Guisante	Bromelaína
Soja y Guisante	Alcalase [®] 2
Soja y Guisante	S2
Soja y Guisante	MP1
Soja y Guisante	ASP-1
Soja y Patata	Serina proteasa
Soja y Patata	ALCALASE [®]
Soja y Patata	GE
Soja y Patata	TL1

ES 2 429 311 T3

(continuación)

Material Proteico	Endopeptidasa
Soja y Patata	LE
Soja y Patata	Bromelaína
Soja y Patata	Alcalase [®] 2
Soja y Patata	S2
Soja y Patata	MP1
Soja y Patata	ASP-1
Soja y Arroz	Serina proteasa
Soja y Arroz	ALCALASE [®]
Soja y Arroz	GE
Soja y Arroz	TL1
Soja y Arroz	LE
Soja y Arroz	Bromelaína
Soja y Arroz	Alcalase [®] 2
Soja y Arroz	S2
Soja y Arroz	MP1
Soja y Arroz	ASP-1
Soja y Trigo	Serina proteasa
Soja y Trigo	ALCALASE [®]
Soja y Trigo	GE
Soja y Trigo	TL1
Soja y Trigo	LE
Soja y Trigo	Bromelaína
Soja y Trigo	Alcalase [®] 2
Soja y Trigo	S2
Soja y Trigo	MP1
Soja y Trigo	ASP-1
Soja y Huevo	Serina proteasa
Soja y Huevo	ALCALASE [®]
Soja y Huevo	GE
Soja y Huevo	TL1
Soja y Huevo	LE
Soja y Huevo	Bromelaína
Soja y Huevo	Alcalase [®] 2
Soja y Huevo	S2
Soja y Huevo	MP1
Soja y Huevo	ASP-1
Soja y Productos Lácteos	Serina proteasa
Soja y Productos Lácteos	ALCALASE [®]
Soja y Productos Lácteos	GE

(continuación)

Material Proteico	Endopeptidasa
Soja y Productos Lácteos	TL1
Soja y Productos Lácteos	LE
Soja y Productos Lácteos	Bromelaína
Soja y Productos Lácteos	Alcalase [®] 2
Soja y Productos Lácteos	S2
Soja y Productos Lácteos	MP1
Soja y Productos Lácteos	ASP-1
Soja y Animal	Serina proteasa
Soja y Animal	ALCALASE [®]
Soja y Animal	GE
Soja y Animal	TL1
Soja y Animal	LE
Soja y Animal	Bromelaína
Soja y Animal	Alcalase [®] 2
Soja y Animal	S2
Soja y Animal	MP1
Soja y Animal	ASP-1

(II) Hidrolizado de Proteínas

La composición de hidrolizado de proteínas generalmente aumenta la liberación de CCK y por lo tanto, promueve la
saciedad cuando se consume. Tal como se ilustra en los ejemplos, una concentración de al menos
aproximadamente 0,5 mg/ml de la composición de hidrolizado de proteína de soja estimula la actividad de liberación
de CCK. El efecto de estimulación de CCK de los hidrolizados óptimos añadidos a entre 0,5 y 8 mg/ml de proteína es
similar a más de un 50 % de la CCK liberada con células STC-1 estimuladas con 100 nM de PMA durante 4 horas.

En una realización, la fracción soluble de una composición de hidrolizado de proteínas puede estimular la actividad
de liberación de CCK de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 100 % de la CCK liberada con células
STC-1 estimuladas con 100 nM de PMA durante 4 horas. En otra realización, la fracción soluble de una composición
de hidrolizado de proteínas puede estimular la actividad de liberación de CCK de aproximadamente un 100 % a
aproximadamente un 200 % de la CCK liberada con células STC-1 estimuladas con 100 nM de PMA durante 4
horas. En una realización más, la fracción soluble de una composición de hidrolizado de proteínas puede estimular la
actividad de liberación de CCK de aproximadamente un 200 % a aproximadamente un 300 % de la CCK liberada
con células STC-1 estimuladas con 100 nM de PMA durante 4 horas. En otra realización más, la fracción soluble de
una composición de hidrolizado de proteínas puede estimular la actividad de liberación de CCK de aproximadamente
un 300 % a aproximadamente un 500 % de la CCK liberada con células STC-1 estimuladas con 100 nM de PMA
durante 4 horas. En otra realización más, la fracción soluble de una composición de hidrolizado de proteínas puede
estimular la actividad de liberación de CCK de aproximadamente un 500 % a aproximadamente un 1000 % de la
CCK liberada con células STC-1 estimuladas con 100nM de PMA durante 4 horas.

El grado de hidrólisis de la composición de hidrolizado de proteínas puede variar y variará dependiendo de la fuente
del material proteico, la proteasa o proteasa usadas, y las condiciones de la reacción de hidrólisis. El grado de
hidrólisis (DH) se refiere al porcentaje de enlaces peptídicos escindidos frente al número de partida de enlaces
peptídicos. Por ejemplo, si una proteína de partida que contiene quinientos enlaces peptídicos se hidroliza hasta que
se escinden cincuenta de los enlaces peptídicos, entonces el DH del hidrolizado resultante es de un 10 %. El grado
de hidrólisis se puede determinar usando el procedimiento de trinitrobenzeno sulfónico (TNBS), el procedimiento
colorimétrico o el procedimiento de orto-ftaldialdehído (OPA), que son conocidos por los expertos en la materia.
Cuanto mayor es el grado de hidrólisis, mayor es la extensión de la hidrólisis de proteínas. Por lo general, a la vez
que la proteína se hidroliza adicionalmente (es decir, el DH más elevado), el peso molecular del fragmento peptídico
disminuye, el perfil peptídico cambia en consecuencia. El DH se puede medir en todo el hidrolizado (es decir, la
fracción completa) o el DH se puede medir en la fracción soluble del hidrolizado (es decir, la fracción de
sobrenadante después de la centrifugación del hidrolizado de aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 x g
durante aproximadamente 5 a aproximadamente 10 minutos).

Típicamente, cada una de las composiciones de hidrolizado de proteínas de la invención tendrá un grado de hidrólisis que varía de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 35 %. En una realización, el grado de hidrólisis de la composición de hidrolizado de proteínas puede variar de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 1 %. En otra realización, el grado de hidrólisis de la composición de hidrolizado de proteínas puede variar de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 %. En una realización más, el grado de hidrólisis de la composición de hidrolizado de proteínas puede variar de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 %. En otra realización más, el grado de hidrólisis de la composición de hidrolizado de proteínas puede variar de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 35 %. En una realización, el grado de hidrólisis de la composición de hidrolizado de proteínas puede variar de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 15 %. En otra realización, el grado de hidrólisis de la composición de hidrolizado de proteínas puede variar de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 3 %.

En general, las composiciones de hidrolizado de proteínas, en comparación con el material de partida de proteínas, comprenderá una mezcla de fragmentos de polipéptidos de longitudes y pesos moleculares diversos. El peso molecular de los fragmentos peptídicos puede variar de 75 Daltons (es decir, glicina libre) a más de 100.000 Daltons, tal como se mide por cromatografía de exclusión por tamaño. En general, los fragmentos de polipéptidos de la composición de hidrolizado de proteínas tendrán un tamaño medio inferior a aproximadamente 100.000 Daltons. En una realización, el tamaño medio de los fragmentos de polipéptidos de la composición de hidrolizado de proteínas puede ser de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 100.000 Daltons. En otra realización, el tamaño medio de los fragmentos de polipéptidos de la composición de hidrolizado de proteínas puede ser inferior a aproximadamente 50.000 Daltons. En una realización más, el tamaño medio de los fragmentos de polipéptidos de la composición de hidrolizado de proteínas puede ser inferior a aproximadamente 10.000 Daltons. En otra realización más, el tamaño medio de los fragmentos de polipéptidos de la composición de hidrolizado de proteínas puede ser inferior a aproximadamente 4.000 Daltons. En otra realización más, el tamaño medio de los fragmentos de polipéptidos de la composición de hidrolizado de proteínas puede ser inferior a aproximadamente 2.000 Daltons.

25 **(III) Productos Alimenticios Que Comprenden Un Hidrolizado De Proteínas**

Un aspecto adicional de la presente invención es un producto alimenticio que comprende un material comestible y una composición de hidrolizado de proteínas que se describe en el presente documento.

La selección de una composición de hidrolizado de proteínas en particular para combinar con un material comestible puede variar y variará dependiendo del producto alimenticio deseado. En algunas realizaciones, la composición de hidrolizado de proteínas puede tener su origen en la proteína de soja. En otras realizaciones, la composición de hidrolizado de proteínas puede tener su origen en la cebada, colza, lupino, maíz, avena, guisante, patata, arroz, trigo, animal, huevo, o combinaciones de los mismos. En realizaciones alternativas, la composición de hidrolizado de proteínas puede comprender una combinación de diferentes hidrolizados de proteínas. Por ejemplo, una composición de hidrolizado de proteína de soja se puede combinar con una combinación de hidrolizado de proteína de maíz. Como alternativa, una composición de hidrolizado de proteína de soja se puede combinar con una composición de hidrolizado de proteínas de colza y una composición de hidrolizado de proteínas de trigo.

En otras realizaciones más, la composición de hidrolizado de proteínas puede tener su origen en una combinación de soja y al menos una otra fuente de proteínas seleccionada entre el grupo que consiste en cebada, colza, lupino, maíz, avena, guisante, patata, arroz, trigo, animal, productos lácteos, y huevo.

En otras realizaciones, la composición de hidrolizado de proteínas puede comprender adicionalmente al menos una proteína no hidrolizada seleccionada entre el grupo que consiste en cebada, colza, lupino, maíz, avena, guisante, patata, arroz, trigo, animal, productos lácteos, y huevo. Los ejemplos no limitantes de proteínas no hidrolizadas adecuadas incluyen leche en polvo seca, leche en polvo seca sin grasa, proteínas de leche, caseína ácida, caseinato (por ejemplo, caseinato sódico, caseinato de calcio, etc.), concentrado de proteína de suero de leche, aislado de proteína de suero de leche, y aislados de proteína de soja.

En algunas realizaciones, la composición de hidrolizado de proteínas incluida en el producto alimenticio puede comprender "pre-péptidos" que se convierten en péptidos "activos" a través de digestión proteolítica en el estómago y/o intestino del sujeto. En otras realizaciones, la composición de hidrolizado de proteínas comprende péptidos "activos" que no necesitan digestión proteolítica adicional en el estómago con los intestinos del sujeto.

La selección del material comestible apropiado también variará dependiendo del producto alimenticio deseado. El material comestible puede ser un material derivado de plantas (por ejemplo, un zumo vegetal, un producto cereal, etc.), un material derivado de animales (por ejemplo, un producto lácteo, un producto de huevo, etc.), o un biomaterial (es decir, una proteína, un nitrato de carbono, un líquido, etc.) aislado a partir un material derivado de plantas o un material derivado de animales, etc.

En una realización, el producto alimenticio puede ser una bebida líquida. Los ejemplos no limitantes de bebidas líquidas incluyen zumos de frutas, bebidas de frutas, bebidas con sabor a frutas, bebidas vegetales, bebidas nutricionales, bebidas energéticas, bebidas deportivas, bebidas de leche de soja, bebidas con sabor a soja, bebidas a base de leche de arroz, bebidas con sabor a leche, bebidas a base de yogur, fórmulas infantiles, bebidas a base

de té, bebidas a base de café, bebidas de sustitución de harinas, batidos de proteínas, bebidas de suplementos nutricionales, bebidas para el control del peso, y combinaciones de los mismos.

5 El material comestible que comprende el producto alimenticio para beber puede variar y variará. Los ejemplos no limitantes de materiales comestibles adecuados incluyen zumos de frutas, somos vegetales, leche desnatada, leche con grasa producida, leche al 2 %, leche entera, crema, leche evaporada, yogur, suero de leche, chocolate, cacao en polvo, café, té, etc.

10 El producto alimenticio para beber puede comprender adicionalmente agentes edulcorantes (tal como glucosa, sacarosa, fructosa, maltodextrina, sucralosa, jarabe de maíz, miel, jarabe de arce, etc.), agentes saborizantes (por ejemplo, chocolate, cacao, sabor a chocolate, extracto de vainilla, sabor a vainilla, sabores de frutas, etc), agentes emulgentes o espesantes (por ejemplo, lecitina, carragenano, goma de celulosa, gel de celulosa, almidón, goma arábica, goma de xantano, y similares); agentes estabilizantes, materiales lípidos (por ejemplo, aceite de colza, aceite de girasol, aceite de girasol alto oleico, grasa en polvo, etc.), conservantes (por ejemplo, sorbato potásico, ácido sórbico, etc.), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, ascorbato sódico, etc.), agentes colorantes, vitaminas, minerales, y combinaciones de los mismos.

15 En otra realización, el producto alimenticio puede ser una barra alimenticia, tal como una barra de cereales, una barra de cereal, una barra nutricional, o una barra energética. En otra realización más, el producto alimenticio puede ser un producto a base de cereales. Los ejemplos no limitantes de productos alimenticios a base de cereales incluyen cereales para desayuno, pasta, panes, productos horneados (es decir, pasteles, tartas, bollos, galletas, galletas saladas), y productos de aperitivos (por ejemplo, virutas, pretzels, etc.). El material comestible de un
20 producto alimenticio a base de cereales puede tener su origen en el trigo (por ejemplo, harina blanqueada, harina de trigo integral, germen de trigo, salvado de trigo, etc.), maíz (por ejemplo, harina fina de maíz, harina de maíz, almidón de maíz, etc.), avena (por ejemplo, avena hinchada, harina de avena, harina fina de avena, etc), arroz (por ejemplo, arroz hinchado, harina de arroz, almidón de arroz), etc. En otra realización más, el producto alimenticio puede ser un producto a base de productos lácteos "sólidos". Los ejemplos no limitantes de productos alimenticios a
25 base de productos lácteos "sólidos" adecuados incluyen productos de queso duro, productos de queso blando, productos de helado, productos de yogur product, productos de yogur congelado, productos de tipo lácteo batido, sorbetes, y similares. En una realización alternativa, el producto alimenticio puede ser un suplemento nutricional. El suplemento nutricional puede ser líquido o sólido. En otra realización alternativa, el producto alimenticio puede ser un producto cárnico o un producto sucedáneo de la carne. Ejemplos de productos alimenticios cárnicos incluyen, pero no se limitan a, carnes procesadas, carnes trituradas, y productos cárnicos de músculo entero. El material cárnico puede ser carne de animal o carne de marisco. El análogo de la carne puede ser una proteína vegetal texturizada o de productos lácteos que imite la textura de la carne animal o de marisco. El análogo de la carne puede ser parte o todo el material cárnico en un producto alimenticio de carne.

Definiciones

35 Para facilitar la comprensión de la invención, a continuación se definen varias expresiones. La expresión "grado de hidrólisis" (DH) se refiere al porcentaje de enlaces peptídicos específicos que se hidrolizaron (es decir, el número de enlaces peptídicos escindidos con respecto al número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína intacta). El % de DH se estimó usando el procedimiento de ácido trinitrobenzeno sulfónico (TNBS), o el de orto-ftaldialdehído (OPA). Estos procedimientos son procedimientos precisos, reproducibles y de aplicación
40 general para determinar el grado de hidrólisis de hidrolizado desde proteína alimenticia.

El término "endopeptidasa" se refiere a una enzima que hidroliza enlaces peptídicos internos en oligopéptidos o en cadenas de oligopéptidos. El grupo de endopeptidasas comprende las subclases de enzimas EC 3.4.21-25 (sistema de clasificación de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular).

45 El término "exopeptidasa" se refiere a una enzima que hidroliza proteínas y/o péptidos a o cerca de sus extremos amino o carboxilo. El grupo de las exopeptidasas comprende las subclases de enzimas EC 3.4.11-18 (sistema de clasificación de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular).

50 Una "enzima de calidad alimentaria" es una enzima que generalmente se reconoce como segura (GRAS) y aprobada y segura cuando es consumida por un organismo, tal como un ser humano. Por lo general, la enzima y el producto a partir del que la enzima puede tener su origen se producen de acuerdo con las directrices aplicables legales y reglamentarias.

55 Un "hidrolizado" es un producto de reacción obtenido cuando un compuesto se escinde a través del efecto del agua. Los hidrolizados de proteínas se producen con posterioridad a la degradación térmica, química, o enzimática. Durante la reacción, las proteínas se descomponen en polipéptidos, y/o aminoácidos libres. Estos productos pueden ser solubles o insolubles en agua o en soluciones tampón a base de agua.

El "procedimiento OPA", tal como se usa en el presente documento, se refiere al siguiente procedimiento: 0,25 g de hidrolizado de proteína de soja se disolvieron en 50 ml de tampón de extracción (SDS al 1 % en Hidróxido Sódico 0,025 N, DTT 0,6 mM) por agitación durante 5 minutos a 65 °C, a continuación se enfrió a 25 °C. La muestra se

centrifugó a continuación a 5000 x g durante 5 minutos para retirar cualquier material sin disolver. A continuación, alícuotas de 0,2 ml de la muestra, patrón de serina (3,6 mM en agua desionizada), y tampón de extracción (usado como un blanco) se transfirieron (por triplicado) a tubos de ensayo, se diluyó con 10 ml de reactivo de color de OPA (OPA 0,012 M, tetraborato sódico 0,1 M, SDS al 2 %), y se agitó vorticialmente para mezclar. Se permitió que las reacciones evolucionaran durante 30 minutos, momento en el que se midieron las absorbancias a 340 nm en un espectrofotómetro. Se usaron medios de cada muestra por triplicado para determinar el % de DH tal como se describe en Nielsen (Nielsen, P.M y col (2001) "Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis", J. Food Sci. 66 (5): 642-646).

Un "péptido" es un polímero corto de aminoácidos, generalmente de 20 aminoácidos o menos. Un "polipéptido" es un polímero de aminoácidos de más de 20. Ambos de estos polímeros contienen solamente la estructura primaria. Los polipéptidos se forman inicialmente durante la síntesis de proteínas, y después del "plegamiento" en su estado nativo (es decir, la formación de estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias) se convierten en proteínas. En esta solicitud, la referencia a un polipéptido se refiere a la generación de un polímero de cadena larga a partir de la hidrólisis de una proteína.

Una "proteína" es un polímero de aminoácidos que forman una molécula activa en su estado nativo (es decir, sin desnaturalizar). El estado nativo de la proteína puede tener estructuras primarias, secundarias, terciarias, y/o cuaternarias. La estructura primaria de una proteína es su secuencia de aminoácidos. Las proteínas tienen por lo general estructura secundaria, que se forma a partir de la interacción de aminoácidos intracatenarios. Estas estructuras se forman a través de enlaces de hidrógeno, y son hélices alfa o "láminas" de aminoácidos de interacción conocidos como láminas beta. Las proteínas por lo general también tienen estructuras terciarias. Las estructuras terciarias se forman a través de la interacción intracatenaria de restos de aminoácidos, y se producen a través de interacciones iónicas, hidrofóbicas, u otras interacciones químicas. Algunas proteínas contienen una o más "subunidades", que interactúan por vía molecular para formar estructuras cuaternarias. Las subunidades de proteínas se componen de una cadena de polipéptidos única y contienen estructuras secundarias y (habitualmente) terciarias.

Las expresiones "aislado de proteína de soja" o "proteína de soja aislada", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un material de soja que tiene un contenido de proteína de al menos aproximadamente un 90 % de proteína de soja en una base sin humedad. Un aislado de proteína de soja se forma a partir de semillas de soja por retirada de la cáscara y del germen de la semilla de soja desde el cotiledón, formación de copos o molienda del cotiledón y retirando el aceite a partir del cotiledón en copos o molido, y separando la proteína de soja y los hidratos de carbono de los cotiledones a partir de la fibra del cotiledón, y separando posteriormente la proteína de soja de los hidratos de carbono.

La expresión "concentrado de proteína de soja" tal como se usa en el presente documento es un material de soja que tiene un contenido de proteína de aproximadamente un 65 % a menos de aproximadamente un 90 % de proteína de soja en una base sin humedad. El concentrado de proteína de soja también puede contener fibra de cotiledón de soja, por lo general de aproximadamente un 3,5 % hasta aproximadamente un 20 % de fibra de cotiledón de soja en peso en una base sin humedad. Un concentrado de proteína de soja se forma a partir de semillas de soja por retirada de la cáscara y del germen de la semilla de soja, formación de copos o molienda del cotiledón y retirando el aceite a partir del cotiledón en copos o molido, y separando la proteína de soja y la fibra de cotiledón de soja a partir de hidratos de carbono solubles del cotiledón.

La expresión "harina de soja", tal como se usa en el presente documento, se refiere a harina de soja con toda su grasa, harina de soja con enzima activa, harina de soja desgrasada, harina de soja parcialmente desgrasada, y mezclas de las mismas. Harina de soja desgrasada se refiere a una forma triturada de material de semilla de soja desgrasada, que contiene preferentemente menos de aproximadamente un 1 % de aceite, formado con partículas que tienen un tamaño de modo que las partículas pueden pasar a través de un tamiz de malla N° 100 (Patrón de Estados Unidos). La torta, virutas, copos, harina de soja, o mezcla de los materiales se Trituran en harina de soja usando procedimientos convencionales de molienda de soja. La harina de soja tiene un contenido de proteína de soja de aproximadamente un 49 % a aproximadamente un 65 % en una base sin humedad. Preferentemente la harina se muele muy finamente, más preferentemente de modo que menos de aproximadamente un 1 % de la harina que ve retenida en un tamiz de malla 300 (Patrón de Estados Unidos). Harina de soja con toda su grasa se refiere a semillas de soja integrales molidas que contienen todo el aceite original, normalmente de un 18 % a un 20 %. La harina puede ser actividad enzimática o se puede procesar por calor o tostar para minimizar la actividad enzimática. Harina de soja de actividad enzimática se refiere a harina de soja con toda su grasa que se ha tratado con calor mínimamente para no neutralizar sus enzimas naturales.

La expresión "leche de soja", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una mezcla acuosa de una cualquiera o más de las siguientes, semillas de soja finamente molidas, harina de soja, copos de soja, concentrado de soja, proteína de soja aislada, proteína de suero de leche de soja, y extractos acuosos de una cualquiera o más de las siguientes: semillas de soja, copos de soja y harina de soja en las que el material insoluble se ha retirado. La leche de soja puede comprender componentes adicionales que incluyen, pero no se limitan a grasas, hidratos de carbono, edulcorantes, colorantes, estabilizantes, espesantes, saborizantes, ácidos, y bases.

La expresión "polvo de leche de soja", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una leche de soja deshidratada. La leche de soja se puede deshidratar mediante muchos procedimientos que incluyen, pero no se limitan a, secado por pulverización, secado en bandeja, secado en túnel, y liofilización.

5 La expresión "procedimiento simplificado de ácido trinitrobenzeno sulfónico (S-TNBS)", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento preciso, reproducible y aplicable por lo general para determinar el grado de hidrólisis de hidrolizados de proteína alimenticia. Para ésto, 0,1 g del hidrolizado de proteína de soja se disolvió en 100 ml de NaOH 0,025 N. Una alícuota (2,0 ml) de la solución de hidrolizado se mezcló con 8 ml de tampón de borato sódico 0,05 M (pH 9,5). Dos ml de la solución de hidrolizado tamponado se trató con 0,20 ml de ácido trinitrobenzeno sulfónico al 10 %, seguido de incubación en la oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se interrumpió mediante la adición de 4 ml de una solución de sulfito sódico 0,1 M-fosfato sódico 0,1 M (relación de 1:99), y la absorbancia se leyó a 420 nm. Una solución de glicina 0,1 mM se usó como el patrón. Se usó el siguiente cálculo para determinar el porcentaje de recuperación de la solución patrón de glicina: [(absorbancia de glicina a 420 nm - absorbancia del blanco a 420 nm) x (100/0,710)]. Los valores de un 94 % o superiores se consideraron aceptables. (Jens Adler-Nissen (1979) "Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid," J. Agric. Food Chem., 27 (6): 1256-1262).

15 Cuando se introducen elementos de la presente invención o la realización o realizaciones preferentes de los mismos, los artículos "un", "uno", "el", y "dicho" pretenden hacer referencia a que hay uno o más de los elementos. Las expresiones "que comprende", "que incluye", y "que tiene" pretenden ser inclusivas y se refieren a que puede haber elementos adicionales distintos de los elementos enumerados.

20 Dado que se podrían hacer diversos cambios en los compuestos, productos y procedimientos anteriores sin apartarse del alcance de la invención, se pretende que toda la materia contenida en la descripción anterior y en los ejemplos que se proporcionan a continuación, se interpretarán como ilustrativos y no en un sentido limitante.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran diversas repeticiones de la invención.

25 **Ejemplo 1. Identificación Sistemática Inicial para la Actividad de Liberación de CCK.**

Un ensayo a base de células se usó para determinar si mezclas complejas de proteínas de soja/péptidos de soja estimulaban la liberación de CCK. Inicialmente se sometieron a ensayo 40 muestras diferentes para determinar que tenían la actividad de estimulación de CCK más elevada. También se evaluó la viabilidad celular después de la exposición a las diversas preparaciones.

30 Una alícuota (0,1 g) de cada muestra liofilizada se reconstituyó en 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM, pH 7,2) a una concentración de reserva de 20 mg/ml (p/v). Después de mezclar suavemente durante aproximadamente 15 minutos, se permitió que las muestras se hidrataran durante una noche a 4 °C, y a continuación se centrifugaron a 16.000 x g durante 30 minutos a 4 °C para retirar el material insoluble. Las fracciones de sobrenadante se diluyeron a 1:10 en medio de cultivo sin suero y se sometieron a ensayo por triplicado para la liberación de CCK a una concentración final de aproximadamente 2 mg/ml. Las células STC-1, una línea celular enteroendocrina de ratón que presenta muchas características de las células de producción de CCK intestinal nativo (Rindi y col. 1990, Am. J. Pathol. 136: 1349-1364; Chang y col., 1994, Biochim. Biophys. Acta 1221: 339-437), se expusieron a las muestras de proteína de soja durante 4 horas en condiciones convencionales. El control negativo fue albúmina de suero bovino (BSA) a 2 mg/ml (p/v) en medios de cultivo sin suero y el control positivo fue PMA 100 nM en 2 mg/ml de BSA (p/v) en medios de cultivo sin suero. El medio condicionado por células se retiró y los niveles de CCK se midieron usando un ensayo de enzimas competitivas. La viabilidad celular se evaluó usando el ensayo de bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Vellomen K-S, Honkakoski P y Urtti A (2004) Substrates and Inhibitors of Efflux Proteins Interfere with the MTT Assay in Cells and May Lead to Underestimation of Drug Toxicity, Eur. J. Pharm. Sci. 23: 181-188).

45 Todas las muestras iniciales con actividad de estimulación de CCK eran hidrolizados. En el conjunto de muestras iniciales, las muestras de proteínas no hidrolizadas no estimularon la liberación de CCK sobre los niveles iniciales. Esto se puede observar para la proteína de soja y caseinato intactas en la **Figura 1**. No se detectaron pérdidas significativas en la viabilidad celular o en la actividad metabólica después de la exposición a cualquiera de las muestras iniciales.

50 Las 40 muestras se volvieron a identificar sistemáticamente con este ensayo a base de células usando preparaciones recién preparadas que las muestras. Mientras que la cantidad absoluta de CCK liberada varió, las mismas 11 muestras se clasificaron como los mejores estimuladores (% de PMA de control fue de un 30 % o mayor).

Ejemplo 2. Fraccionamiento de una Muestra de Liberación de CCK Potente.

55 La muestra 9 (es decir, SUPRO[®]950/FXP950, que es proteína de soja aislada hidrolizada con ALCALASE[®]) tuvo una de las actividades de liberación de CCK más elevadas. Para estimar los pesos moleculares de los péptidos en esta

muestra, se fraccionó por filtración de flujo tangencial. Para ésto, una suspensión al 5 % de la muestra se fraccionó usando una unidad de filtración de flujo tangencial equipada con una membrana de lámina plana de MWCO de 100 kDa (Lab 20, Alfa Laval, Reino Unido). El material retenido se recogió (es decir, una fracción superior a 100 kDa) y el permeado se fraccionó usando la misma unidad de filtración equipada con una membrana de lámina plana de MWCO de 10 kDa para formar una fracción de 10-100 kDa y una fracción inferior a 10 kDa. Las fracciones se liofilizaron, se volvieron a suspender en PBS, se diluyeron en medios de cultivo sin suero, y cuatro concentraciones (p/v) de cada una se sometieron a ensayo para la actividad de liberación de CCK en células STC-1 tal como se ha detallado anteriormente.

La Tabla 1 presenta los resultados. Las fracciones de 10-100 kDa e inferiores a 10 kDa tuvieron la actividad de estimulación de la liberación de CCK más elevada. Las fracciones también se resolvieron por SDS-PAGE (véase la **Figura 2**) y en cada fracción estaban presentes péptidos de bajo peso molecular. Este descubrimiento sugiere que moléculas de bajo y alto peso molecular pueden estar interactuando a través de interacciones hidrofóbicas u otras interacciones y, en consecuencia, no se separan bien mediante este procedimiento. Sin embargo, es evidente, que los péptidos de bajo peso molecular inducen la liberación de CCK y representan la actividad observada en las fracciones de peso molecular más elevado.

Tabla 1. Actividad de Liberación de CCK de Muestras Fraccionadas.

Nº		Media de liberación de CCK (ng/ml) ± etm	Liberación de CCK (% de liberación de PMA)
41	Muestra de partida (SUPRO [®] 950/FXP950*)		
	8 mg/ml	0,166 ± 0,017	95,7 %
	2 mg/ml	0,117 ± 0,012	53,8 %
	0,5 mg/ml	0,069 ± 0,005	12,8 %
	0,125 mg/ml	0,056 ± 0,003	1,7 %
42	> fracción de 100 kDa		
	8 mg/ml	0,161 ± 0,006	91,5 %
	2 mg/ml	0,105 ± 0,004	43,6 %
	0,5 mg/ml	0,073 ± 0,002	16,2 %
	0,125 mg/ml	0,059 ± 0,002	4,3 %
43	fracción de 10-100 kDa		
	8 mg/ml	0,204 ± 0,003	128,2 %
	2 mg/ml	0,141 ± 0,003	74,4 %
	0,5 mg/ml	0,079 ± 0,023	21,4 %
	0,125 mg/ml	0,085 ± 0,021	26,5%
44	< fracción de 10 kDa		
	8 mg/ml	0,183 ± 0,015	110,3 %
	2 mg/ml	0,122 ± 0,016	58,1 %
	0,5 mg/ml	0,100 ± 0,007	39,3 %
	0,125 mg/ml	0,079 ± 0,005	21,4 %
	Control negativo (BSA)	0,054 ± 0,002	
	Control positivo (PMA)	0,171 ± 0,003	
* ISP tratado con ALCALASE [®]			

Ejemplo 3. Actividad de Liberación de CCK de una Fracción Potente de Hidrolizado de Liberación de CCK Después de Digestión con Pepsina y Pepsina-Pancreatina para Imitar la Digestión In Vivo en el Intestino

La **Figura 3** muestra la estimulación de la liberación de CCK mediante preparaciones digeridas con pepsina y pepsina-pancreatina de la fracción de 10 - 100 kDa de SUPRO[®]950/FXP950, una preparación de proteína hidrolizada que se describe en el Ejemplo 2, que muestra que la actividad de liberación de CCK de esta fracción de hidrolizado que péptidos se mantuvo después de la digestión de esta fracción con enzimas que se sabe que están presentes en el tracto digestivo de seres humanos y otros animales. El procedimiento de digestión con pepsina y pepsina-pancreatina, para imitar la digestión en el estómago e intestinal superior in vivo, es una modificación de los procedimientos que se han publicado anteriormente de Schasteen (Schasteen, C.S., y col., (2007) Correlation of an Immobilized Digestive Enzyme Assay With Poultry True Amino Acid Digestibility for Soybean Meal. Poultry Science 86 (2), 343-348) e Higaki (Higaki, N., y col., (2006) Biosci. Biotechnol. Biochem. 70 (12), 2844-2852). Las muestras de proteínas se solubilizaron en 20 volúmenes de HCl 0,01 M y se digirieron con pepsina (Sigma-Aldrich N° P7012)

a una relación de enzima-sustrato de 1:200 (p/p), pH 2,3 y 37 °C durante 4 hora. Después de la digestión con pepsina, se añadió NaOH 2,5 M a la mezcla para ajustar el pH a 8,0, y se añadió pancreatina (Sigma-Aldrich N° P3292) a una relación de 1:200 (p/p) y la digestión continuó durante otras 4 a 18 horas. El grado de hidrólisis se determinó mediante la reacción de grupos amina primaria con o-ftalaldehído (OPA) frente a la cantidad total de amina primaria presente en la muestra después de hidrólisis ácida (110 °C durante 24 horas). Los hidrolizados de proteína se añadieron a los medios de células STC-1 a una concentración de proteína de 0,5 a 8 mg/ml, y los controles de enzima se añadieron a diluciones equivalentes de la mezcla de reacción de control (que incluía la enzima o enzimas en ausencia de sustrato de proteína). Se representa la concentración absoluta de CCK (ng/ml) liderada en los medios de células STC-1 estimuladas con las muestras de hidrolizado de proteínas tratado con pepsina y pepsina-pancreatina. La concentración de CCK estimulada con PMA 100 nM de control positivo y 2 mg/ml de BSA de control negativo se muestran mediante las flechas marcadas como 'Control de PMA' y 'Liberación de CCK en la Medida Inicial', respectivamente, en la **Figura 3**.

Ejemplo 4. Actividad de Liberación de CCK de Hidrolizados de Proteína de Soja.

La actividad de liberación de CCK de varios hidrolizados diferentes de proteína de soja con diversos grados de hidrólisis también se analizó. Para ésto, proteína de soja aislada se hidrolizó con ALCALASE®, bromelaína, serina proteasa, Alcalase® 2, S2, MP1, TL1, y ASP-1. La cantidad de enzima añadida y/o la duración del período de incubación se ajustaron para dar diversos grados de hidrólisis. Células STC-1 se expusieron a los diferentes hidrolizados diluidos a una concentración final de proteína de aproximadamente 2 mg/ml. La liberación de CCK se sometió a ensayo tal como se ha descrito anteriormente. La **Figura 4** ilustra la estimulación de la liberación de CCK para diferentes preparaciones de hidrolizado de proteína de soja. Se representa el % de CCK liberada en los medios de STC-1 estimulados con los diferentes hidrolizados de proteína de soja generados con las diferentes enzimas tal como se indica en las **Figuras 4A-4H** y con diferentes % de grados de hidrólisis (% de DH) obtenidos con las diversas condiciones de incubación en comparación con el % de con CCK liberada con PMA, que se estableció a un 100 %.El % de CCK liberada en los medios de cultivo celular se calcula como sigue a continuación:

$$\% \text{ de liberación de CCK} = \frac{(\text{ng de CCK}_{\text{pocillo de muestra}} - \text{ng de CCK}_{\text{pocillo de control de BSA}})}{(\text{ng de CCK}_{\text{pocillo de PMA}} - \text{ng de CCK}_{\text{pocillo de control de BSA}})} \times 100$$

PMA induce CCK a través de una estimulación directa de la proteína quinasa C (PKC). Cada hidrolizado de proteína de soja se añadió a células STC-1 a una concentración final de proteína de aproximadamente 2 mg/ml. La capacidad relativa de los hidrolizados de soja para inducir la liberación de CCK mediante las células STC-1 es dependiente de la enzima y del grado de hidrólisis.

Ejemplo Experimental 1. Barra de Alimento que Contiene Hidrolizados de Proteína de Soja.

En este Ejemplo Experimental, muestras de barras de alimento que comprenden material proteico y jarabes de azúcar se producen usando ingredientes enumerados en la Tabla 2, dada a continuación.

Para obtener las barras de alimento, se produce una primera mezcla en una mezcladora Hobart (Mezcladora N50 5-Quart, Mezcladora Legacy® Countertop, Mezcladora Legacy® Floor, Hobart Corporation, Tory, OH). Mezclar jarabe de tipo azúcar, azúcar cristalino, glicerina, aceite líquido, inclusiones líquidas, gomas, y aromas naturales o artificiales en el cuenco. Mezclar la mezcla de suspensión durante 1 minuto con una velocidad ajustada a 2. Raspar el cuenco con una espátula de modo que el lado del cuenco esté limpio.

Después de mezclar la suspensión durante 1 minuto, añadir aislado de proteína de soja, hidrolizado de proteína de soja, e inclusiones de partículas en el cuenco de mezcla. Mezclar la mezcla durante 1 minuto a una velocidad ajustada a 1, Raspar el cuenco con una espátula hasta que el lado del cuenco este limpio. Mezclar durante otros 30 segundos con una velocidad usada a 1. La masa resultante se lamina a continuación sobre una plancha y las barras se cortan en piezas que pesan de aproximadamente 20 gramos a aproximadamente 70 gramos.

Tabla 2. Formulación Básica de Barra de Alimento

Ingredientes	Intervalo (en gramos)
Jarabe de tipo azúcar	10-40 %
Azúcar, cristalina	2-10 %
Glicerina	1-10 %
Aceite Líquido	1-10 %
Inclusiones líquidas	

(continuación)

Ingredientes	Intervalo (en gramos)
Gomas	0,1-5 %
Sabor Natural o Artificial	0,01-3 %
Aislado de Proteína de Soja	1-40 %
Hidrolizado de Proteína de Soja	1-40 %
Inclusiones de Partículas	1-10 %
Total	

Ejemplo Experimental 2: Bebida Ácida Que Contiene Hidrolizados De Proteína de Soja.

5 Se prepara una bebida ácida de acuerdo con la presente invención. 130,0 partes de ingrediente de proteína de soja y 8539 partes de agua se añaden a un recipiente. Los contenidos se mezclan a alta cizalla hasta que se dispersan uniformemente. La dispersión se calienta a continuación de 74 °C a 79 °C (de 165 °F a 175 °F) y se mezcla durante un período adicional de 10 minutos. A continuación se añaden, con mezcla, 1180 partes jarabe de maíz alto en fructosa, 131 partes de concentrado de zumo de manzana (68 Brix) y 20,0 partes de ácido cítrico anhidro. El pH se ajusta a 3,8-4,0 con ácido cítrico al 85 %. Los contenidos se homogenizan a 17 Mpa (2500 libras por pulgada cuadrada) en la primera etapa y a 3,4 Mpa (500 libras por pulgada cuadrada) en la segunda etapa seguido de
10 pasteurización a 107 °C durante 7 segundos. Las botellas se llenan con la bebida caliente con troteos se colocan en un baño de hielo para llevar la temperatura de la bebida a aproximadamente temperatura ambiente y se colocan en el refrigerador.

Ejemplo Experimental 3. Una Mezcla Seca Que Contiene Hidrolizados de Proteína de Soja.

15 El siguiente Ejemplo Experimental ilustra la preparación de la mezcla seca que contiene la proteína de la presente invención con componentes que se enumeran en la Tabla 3 que sigue a continuación.

Tabla 3

Componente	Partes en Peso	Gramos por Ración
Hidrolizados de Proteína de Soja	56,85	16,89
Fructosa	20,23	6,01
Sacarosa	20,22	6,01
Extracto de Crema Seca	1,01	0,30
Sabor a Helado de Vainilla	1,35	0,40
Cloruro Sódico	<u>0,34</u>	<u>0,10</u>
Total	100,00	29,71

Los ingredientes se añaden a un recipiente y se mezclan para formar una mezcla seca.

Ejemplo Experimental 4 - Una bebida que contiene la mezcla seca tal como se prepara en el Ejemplo Experimental 3

20 Una bebida lista para beber se prepara por adición a un líquido de una mezcla seca tal como se prepara en el Ejemplo Experimental 3. El orden de adición no es importante.

Dentro de la bebida lista para beber, el líquido está presente de aproximadamente un 85 % hasta aproximadamente un 95 % en peso de la composición total, y el pH de la bebida lista para beber es de aproximadamente 6,8 hasta aproximadamente 7,4.

25 El Ejemplo Experimental 4 es la bebida de la invención lista para beber preparada por adición de 29,71 gramos del producto del Ejemplo Experimental 3 a 240 ml de leche descremada. Los contenidos se mezclan durante 30 segundos.

Ejemplo Experimental 5 - Una bebida que contiene la mezcla seca tal como se prepara en el Ejemplo Experimental 3

Una bebida lista para beber se prepara por adición a un líquido de una mezcla seca tal como se prepara en el Ejemplo Experimental 3. El orden de adición no es importante.

- 5 Dentro de la bebida lista para beber, el líquido está presente de aproximadamente un 85 % hasta aproximadamente un 95 % en peso de la composición total, y el pH de la bebida lista para beber es de aproximadamente 6,8 hasta aproximadamente 7,4.

El Ejemplo Experimental 5 es la bebida de la invención lista para beber preparada por adición de 29,71 gramos del producto del Ejemplo Experimental 3 a 240 ml de agua. Los contenidos se mezclan durante 30 segundos.

10 **Experimental Ejemplo 6. Leche de Soja Baja en Grasa Sin Potenciadores Del Sabor Que Contiene los Hidrolizados de Proteína de soja**

Tamaño de la ración: 8,5 g de proteína/250 g.

Tabla 4 Fórmula para Leche de Soja Baja en Grasa

Ingredientes	% en la fórmula
Agua Destilada	89,4
Citrato potásico	0,25
Hidrolizado de proteína de soja*	3,8-4,2
Maltodextrina	4-4,4
Azúcar	1,4
Aceite de Girasol Alto Oleico	0,72
Carragenano	0,03
* El porcentaje de hidrolizado de proteína de soja usado en la fórmula se ajustó dependiendo del contenido de proteína como tal	

- 15 Dispersar citrato en agua a 60 °C (140 °F). Aumentar la velocidad de mezcla y dispersar proteína en agua. Después dispersar la proteína minuciosamente, aumentar la temperatura de la suspensión a 75 °C (167 °F), reducir la velocidad de mezcla y continuar mezclando durante 10 minutos. Mezclar previamente maltodextrina, azúcar y carragenano, añadir a la suspensión de proteína y continuar mezclando a velocidad baja durante 5 minutos. Añadir aceite de girasol a la suspensión y continuar mezclando a baja velocidad hasta homogeneidad durante aproximadamente 3 minutos. Ajustar el pH de la suspensión usando hidróxido potásico al 45 % entre 7,0 y 7,2.
- 20 Procedimiento como sigue a continuación: homogeneización, pasteurización y enfriamiento. Calentar el producto a 72 °C (162 °F) y homogeneizar a 5,1 MPa, segunda etapa; 15,3 MPa, primera etapa. Calentar previamente la suspensión a 100 °C (212 °F) y UHT a 141 °C (286 °F) durante 6 segundos. Enfriar el producto a 31 °C (88 °F) y envasar en botellas esterilizadas. Almacenar refrigerado.

Ejemplo Experimental 7. Bebida Sin Potenciadores Del Sabor Que Contiene Hidrolizados de Proteína de soja al 50 % y Leche Descremada al 50 %.

- 25 Tamaño de la ración: 8 g de proteína/260 g

Tabla 5 Fórmula para Bebida Sin Potenciadores Del Sabor

Ingredientes	% en la fórmula
Agua Destilada	43,9
Hidrolizados de proteína de soja*	1,71-1,9
Leche descremada	50
Maltodextrina	1,95-2,12
Azúcar	1,0
Aceite de Girasol Alto Oleico	0,84

(continuación)

Ingredientes	% en la fórmula
Citrato sódico, deshidratado	0,05
Fosfato de magnesio, dibásico	0,038
Gel de celulosa	0,25
Carragenano	0,02
Mezcla previa de vitaminas/minerales	0,006
* El porcentaje de hidrolizados de proteína de soja usado en la fórmula se ajustó dependiendo del contenido de proteína como tal	

5 Dispersar citrato en agua totalmente desionizada a 15 °C (59 °F) usando velocidad de mezcla moderada. Dispersar SUPRO® Plus en agua. Después de haber dispersado todos los grumos, calentar la suspensión a 77 °C (170 °F) y continuar mezclando a velocidad baja durante 10 minutos. Mezclar en seco maltodextrina, azúcar, mezcla previa de vit/min, fosfato de magnesio, celulosa y carragenano. Añadir la mezcla seca a la suspensión de proteína y continuar mezclando durante 5 minutos. Añadir aceite de girasol y continuar mezclando durante 3 minutos. Medir el pH de la suspensión y ajustar el pH si fuera necesario a pH de 6,9 a 7,1 usando solución de ácido cítrico al 50 % o NaOH 1 N.

10 Calentar leche descremada lentamente a 72 °C (162 °F) y añadir suspensión de proteína a la leche descremada caliente. Añadir agentes saborizantes y mezclar hasta que se incorporen completamente en la suspensión. Mezclar durante 3 minutos con mezcla lenta y registrar el pH final de la suspensión. Procedimiento como sigue a continuación: Calentar el producto a 72 °C (162 °F) y homogeneizar a 5,1 MPa, segunda etapa, 15,3 MPa, primera etapa. Calentar previamente la suspensión a 104 °C (220 °F) y UHT a 141 °C (286 °F) durante 6 segundos. Enfriar el producto a 31 °C (88 °F) y envasar. Almacenar refrigerado.

15 **Ejemplo Experimental 7. Bebida para el Control del Peso con Sabor a Vainilla Que Contiene Caseinato Cálcico y Leche Seca Sin Grasa (NFDM) e Hidrolizado de Proteína de Soja Como Las Fuentes de Proteína**

Tamaño de la ración: 10 g de proteína/312 g (11 oz)

Tabla 6 Fórmula para Bebida para el Control del Peso con Sabor a Vainilla

Ingredientes	% en la fórmula	
	Todo proteína leche	Reemplazo de caseinato de Ca al 20 % que contiene soja
Agua Destilada	82,4	82,5
Hidrolizado de proteína de soja	0,0000	0,68-0,71
NFDM	6,39	6,39
Sacarosa	7,0	7,0
Goma Arábica	1,31	1,31
Caseinato Cálcico (85,5 %)	0,68	0
Gel de Celulosa	0,35	0,35
Aceite de Colza	0,77	0,74
Citrato Potásico	0,14	0,13
Citrato Sódico	0,05	0,04
Lecitina	0,07	0,07
Carragenano	0,04	0,04
Carbonato Cálcico	0,06	0,03
Carbonato de Magnesio	0	0,02
Fosfato de Magnesio, dibásico	0,25	0,21

(continuación)

Ingredientes	% en la fórmula	
	Todo proteína leche	Reemplazo de caseinato de Ca al 20 % que contiene soja
Mezcla previa de Vit/Min.	0,07	0,07
Sabor a vainilla	0,40	0,40

Preparar una mezcla previa como sigue a continuación: mezclar el carragenano y celulosa con una pequeña porción de la sacarosa de la fórmula. Mezclar la goma arábica y la sacarosa restante. Mezclar aceite de colza.

5 A continuación mezclar: Añadir el citrato potásico y sódico a agua usando mezcla a alta cizalla. A continuación dispersar la mezcla previa de carragenano y celulosa. Mezclar durante 5 minutos. Dispersar la proteína de soja, caseinato de calcio y NFDM y comenzará calentar a 65 °C (150 °F). Hidratar durante 15 minutos, reducir la velocidad de mezcla después de alcanzar 65 °C (150 °F). Calentar la mezcla de aceite de colza/emulgente a aproximadamente 70 °C (158 °F) para disolver los emulgentes, esto puede necesitar algo de mezcla. A continuación añadir la mezcla de aceite caliente al tanque de carga, mezclar 5 minutos, se dispersará la espuma. Añadir la mezcla previa de 10 mezcla de sacarosa/goma arábica, carbonato de calcio, fosfato de magnesio, carbonato de magnesio y vitaminas, mezclar durante 10 minutos. Añadir sabor de vainilla y ajustar el pH con KOH al 45 % a 7,0 - 7,2, UHT a 141 °C (286 °F)/6 segundos, 17/3,4 MPa (2500/500 psi).

Ejemplo Experimental 8. Bebida de Rendimiento, Bebida Mezclada en Seco que Contiene Hidrolizados de Proteína de Soja.

15

Tabla 7 Fórmula para Bebida de Rendimiento Mezclada en Seco

Ingredientes	% en la fórmula
Hidrolizados de proteína de soja	16,2-16,9
Aislado de Proteína Suero de Leche (un 92,7 % de proteína como tal)	15,81
Azúcar	3,25
Fructosa	3,25
Cacao	3,00
Grasa en Polvo	1,40
Goma de Xantano	0,40
Mezcla Previa de Vitaminas,	0,06
Sucralosa	0,04
Potenciador de la Dulzura,	0,30
Sabor a Chocolate	0,65
Crema	0,20
Total	44,8 - 45,3

Limpiar y esterilizar el mezclador. Tamizar la proteína de soja y el cacao en polvo. Mezclar todos los ingredientes durante 15 minutos a velocidad media. Almacenar el polvo seco en envases esterilizados.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una fracción soluble de una composición de hidrolizado de proteínas, comprendiendo la composición una mezcla de fragmentos de polipéptidos que tienen un tamaño medio inferior a aproximadamente 100.000 Daltons, comprendiendo dicha mezcla una fracción de polipéptidos de 10.000-100.000 Daltons, en la que una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mg/ml de la composición de hidrolizado de proteínas estimula la actividad de liberación de colecistoquinina con una potencia básicamente similar a más de un 50 % de la colecistoquinina liberada por células STC-1 estimuladas con 100 nM de 12-miristato-13-acetato de forbol durante 4 horas.
2. La composición de hidrolizado de proteínas de la reivindicación 1, en la que la composición de hidrolizado de proteínas tiene un grado de hidrólisis de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 35 %.
- 10 3. La composición de hidrolizado de proteínas de la reivindicación 1, en la que la composición de hidrolizado de proteínas tiene su origen en un material proteico seleccionado entre el grupo que consiste en soja, cebada, colza, lupino, maíz, avena, guisante, patata, arroz, trigo, huevo, animal, y combinaciones de los mismos.
- 15 4. La composición de hidrolizado de proteínas de la reivindicación 1, en la que la composición de hidrolizado de proteínas tiene su origen en un material de proteína de soja en combinación con un material proteico seleccionado entre el grupo que consiste en cebada, colza, lupino, maíz, avena, guisante, patata, arroz, trigo, huevo, productos lácteos, animal, y combinaciones de los mismos.
5. La composición de hidrolizado de proteínas de la reivindicación 1, en la que la composición de hidrolizado de proteínas tiene su origen en material de proteína de soja, y la composición de hidrolizado de proteínas tiene un grado de hidrólisis de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 35 %.
- 20 6. Un procedimiento para aumentar la actividad de liberación de colecistoquinina de una célula, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la célula con una fracción soluble de una composición de hidrolizado de proteínas, comprendiendo la composición una mezcla de fragmentos de polipéptidos que tienen un tamaño medio inferior a aproximadamente 100.000 Daltons, comprendiendo dicha mezcla una fracción de polipéptidos de 10.000-100.000 Daltons, en el que una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mg/ml de la composición de hidrolizado de proteínas estimula la actividad de liberación de colecistoquinina con una potencia básicamente similar a más de un 50 % de la colecistoquinina liberada por células STC-1 estimuladas con 100 nM de 12-miristato-13-acetato de forbol durante 4 horas.
- 25 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la composición de hidrolizado de proteínas tiene un grado de hidrólisis de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 35 %.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la composición de hidrolizado de proteínas tiene su origen en material de proteína de soja en combinación con un material proteico seleccionado entre el grupo que consiste en cebada, colza, lupino, maíz, avena, guisante, patata, arroz, trigo, huevo, productos lácteos, animal, y combinaciones de los mismos.
- 35 9. El procedimiento de la reivindicación 6, en la que la composición de hidrolizado de proteínas tiene su origen en material de proteína de soja.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el material de proteína de soja está seleccionado entre el grupo que consiste en extracto de soja, leche de soja, leche de soja en polvo, cuajada de soja, harina de soja desgrasada, harina de soja parcialmente desgrasada, harina de soja con toda su grasa, proteína de soja aislada, concentrado de proteína de soja, y una combinación de los mismos.
- 40 11. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la composición de hidrolizado de proteína de soja está producida al someter un material de partida de proteínas a digestión enzimática.
- 45 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la enzima es una endopeptidasa seleccionada entre el grupo que consiste en serina proteasa (SP1) de *Nocardioopsis prasina*, serina proteasa de *Bacillus licheniformis*, subtilisina proteasa de *Bacillus licheniformis*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, lisil endopeptidasa de *Achromobacter lyticus*, subtilisina proteasa 2, metalo proteasa 1, aspartato proteasa 1, bromelaína, subtilisina, y combinaciones de las mismas.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la enzima comprende adicionalmente una exopeptidasa.
- 50 14. Un procedimiento para promover saciedad en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar al sujeto una cantidad de una fracción soluble de una composición de hidrolizado de proteínas, comprendiendo la composición una mezcla de fragmentos de polipéptidos que tienen un tamaño medio inferior a aproximadamente 100.000 Daltons, y un grado de hidrólisis de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 35 %, comprendiendo dicha mezcla una fracción de polipéptidos de 10.000-100.000 Daltons, en el que una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mg/ml de la composición de hidrolizado de proteínas estimula la actividad de liberación de colecistoquinina con una potencia básicamente similar a más de un 50 % de la colecistoquinina

liberada por células STC-1 estimuladas con 100 nM de 12-miristato-13-acetato de forbol durante 4 horas, en el que la cantidad administrada da como resultado una sensación de saciedad en el sujeto.

15. Un producto alimenticio, comprendiendo el producto alimenticio:

- 5 (a) un material comestible; y
 - (b) una fracción soluble de una composición de hidrolizado de proteínas, comprendiendo la composición una mezcla de fragmentos de polipéptidos que tienen un tamaño medio inferior a aproximadamente 100.000 Daltons, comprendiendo dicha mezcla una fracción de polipéptidos de 10.000-100.000 Daltons, en el que una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mg/ml de la composición de hidrolizado de proteínas estimula la actividad de liberación de colecistoquinina con una potencia básicamente similar a más de un 50 % de la colecistoquinina liberada por células STC-1 estimuladas con 100 nM de 12-miristato-13-acetato de forbol durante 4 horas.
- 10

Figura 1

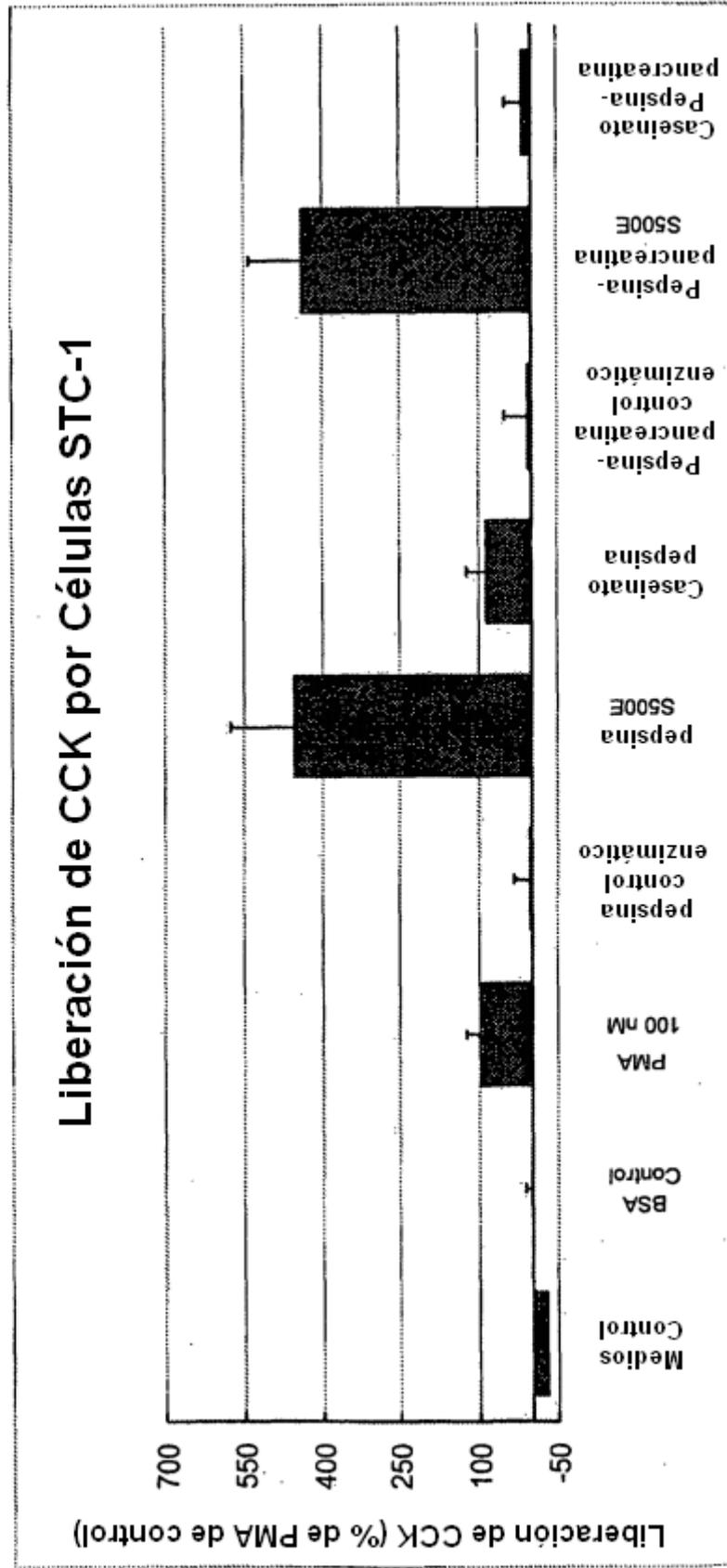


Figura 2

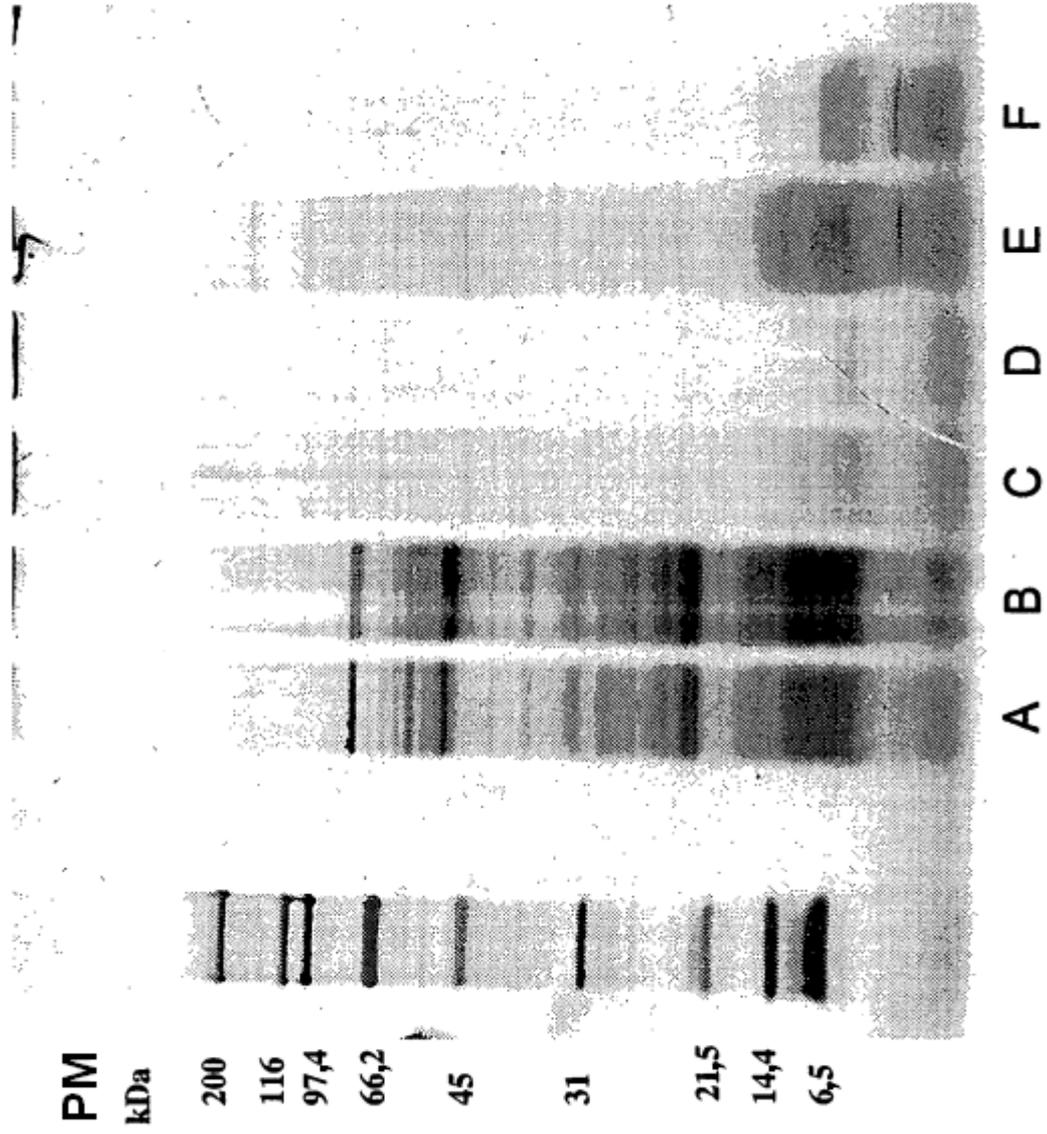


Figura 3

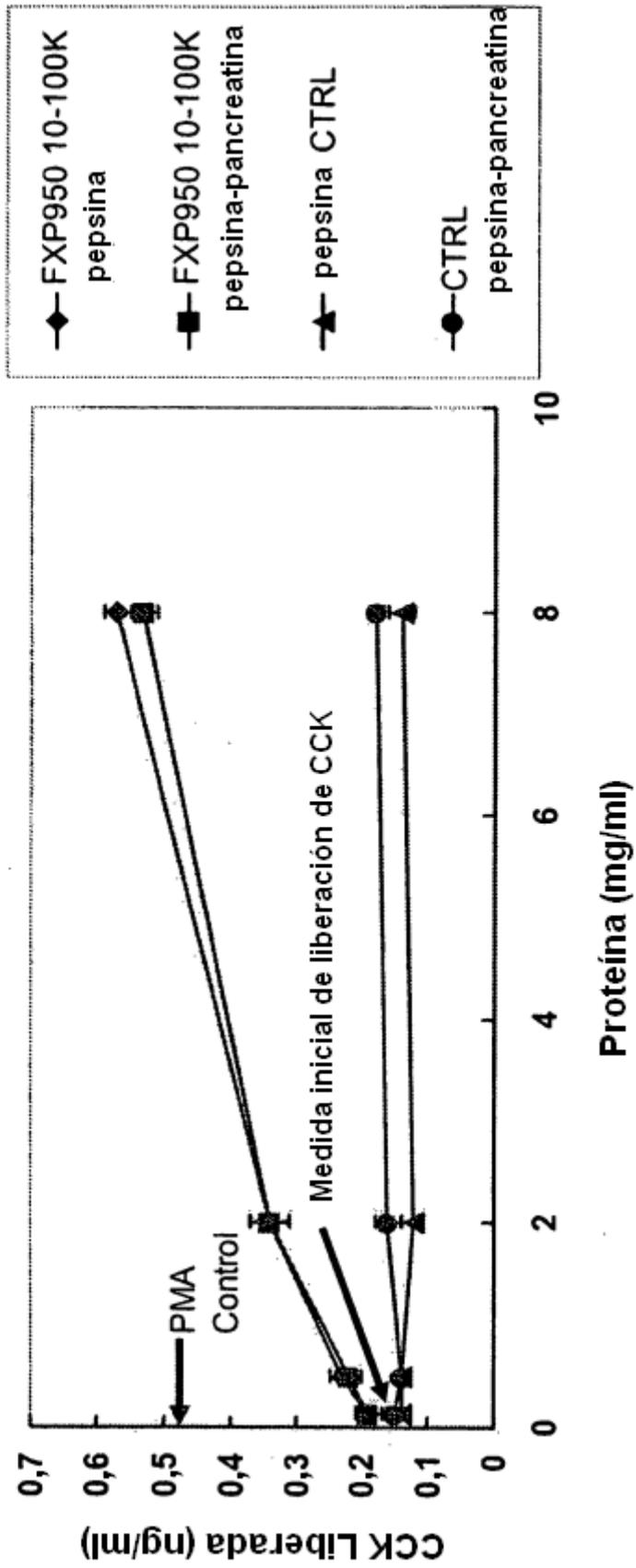


Figura 4A

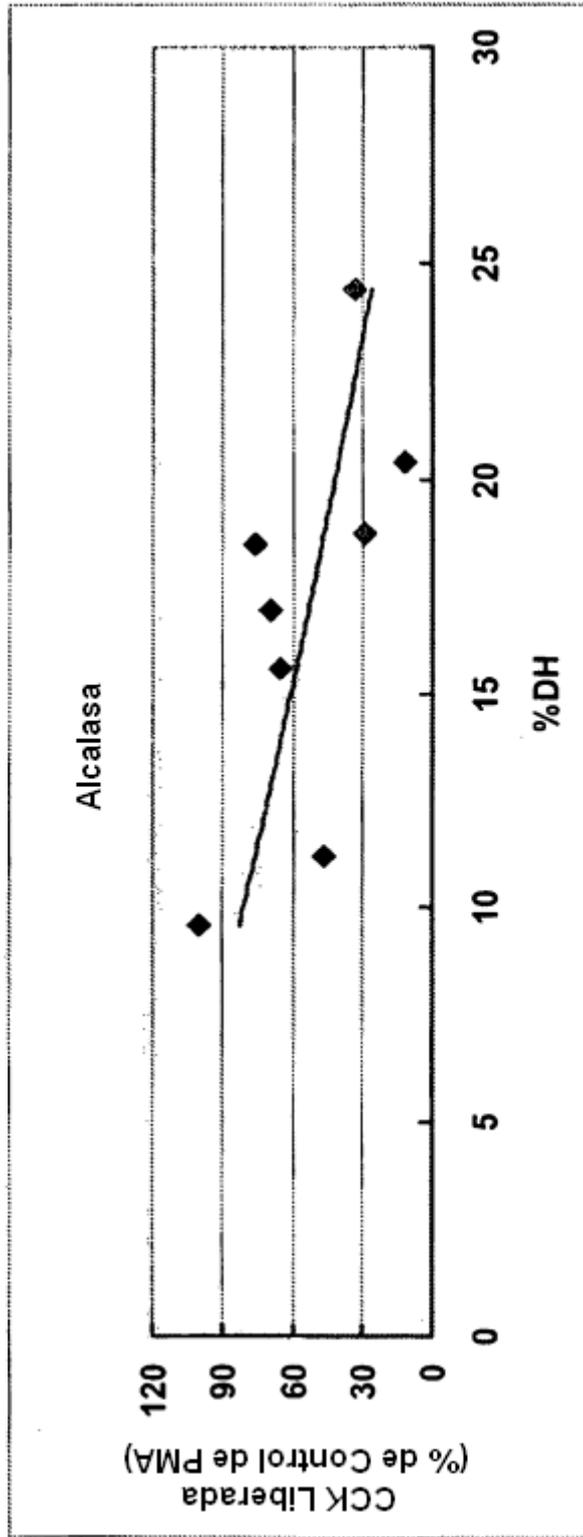


Figura 4B

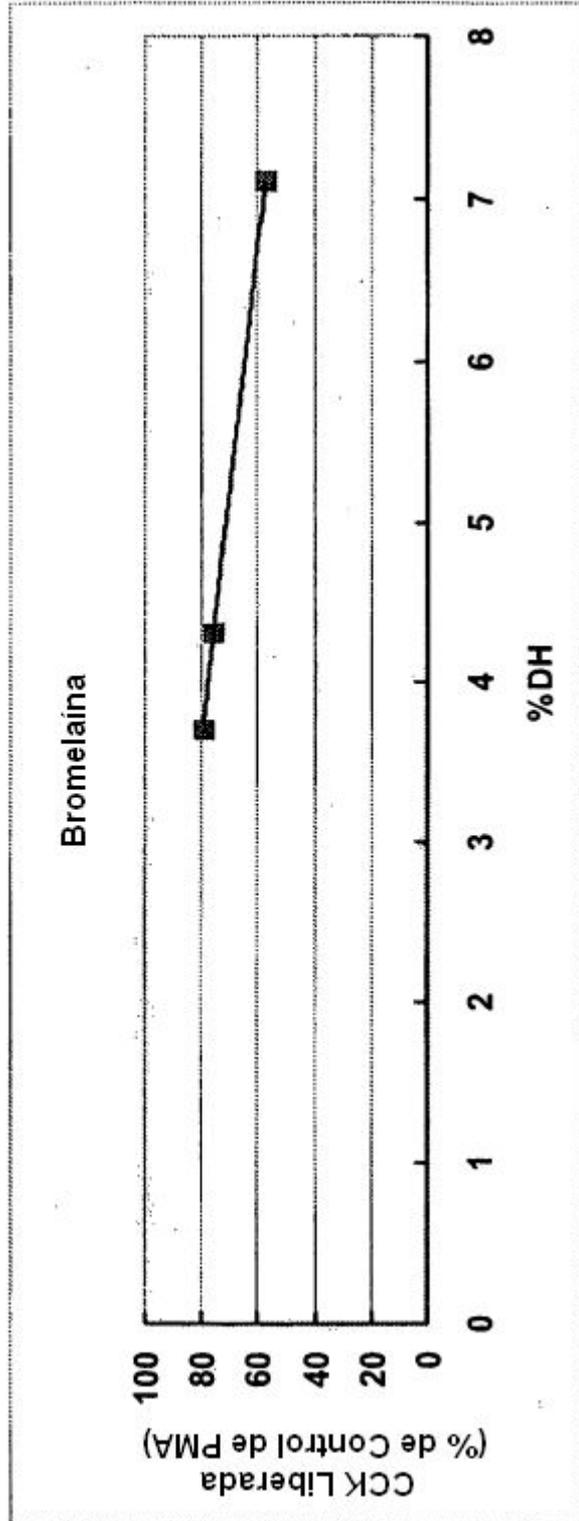


Figura 4C

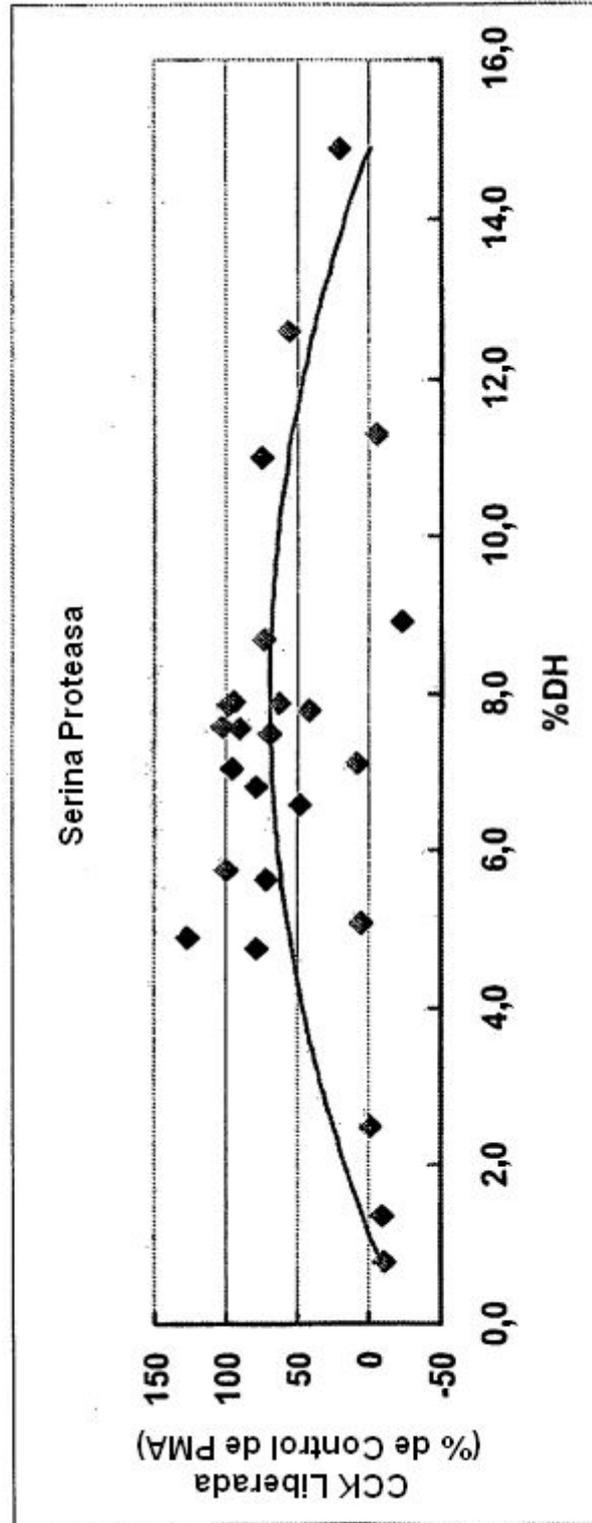


Figura 4D

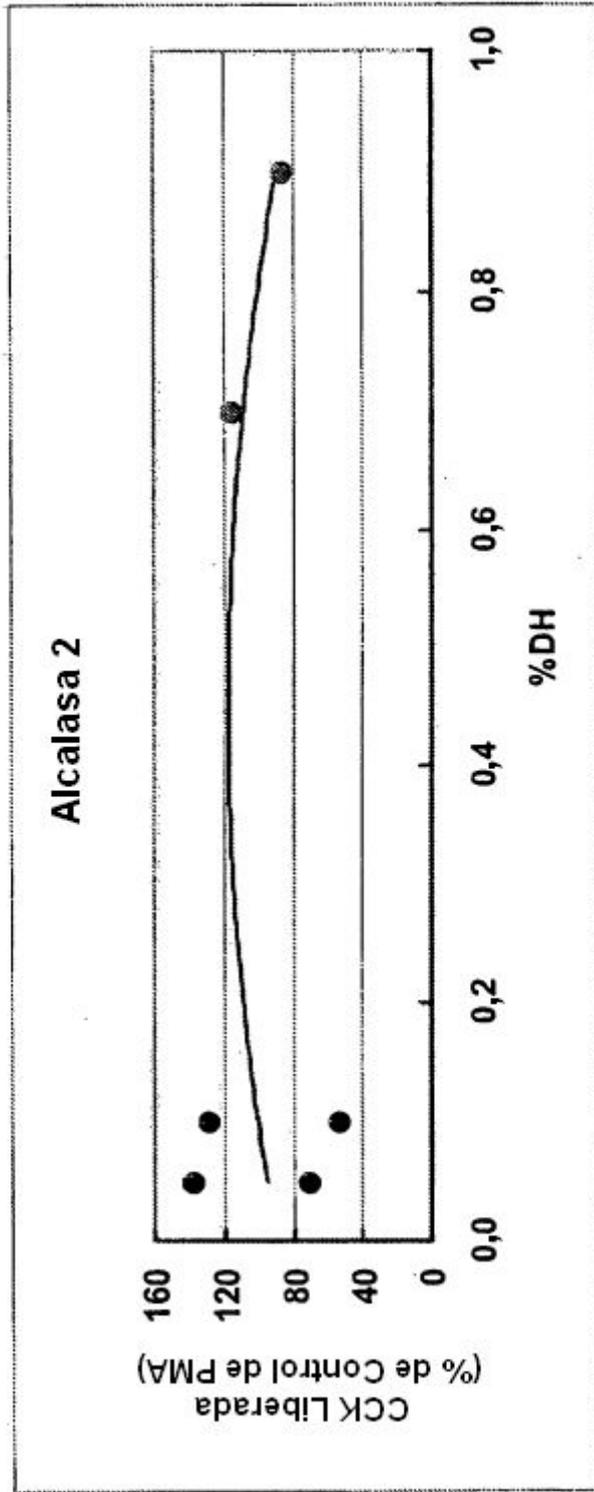


Figura 4E

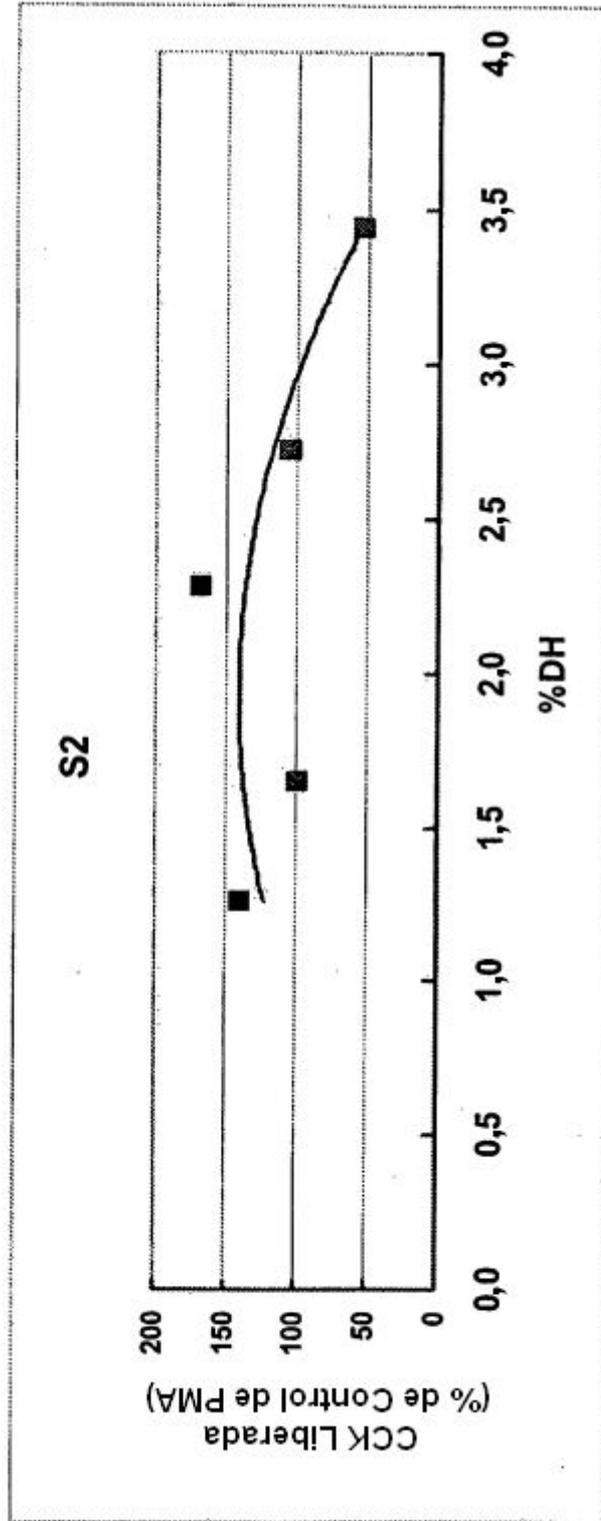


Figura 4F

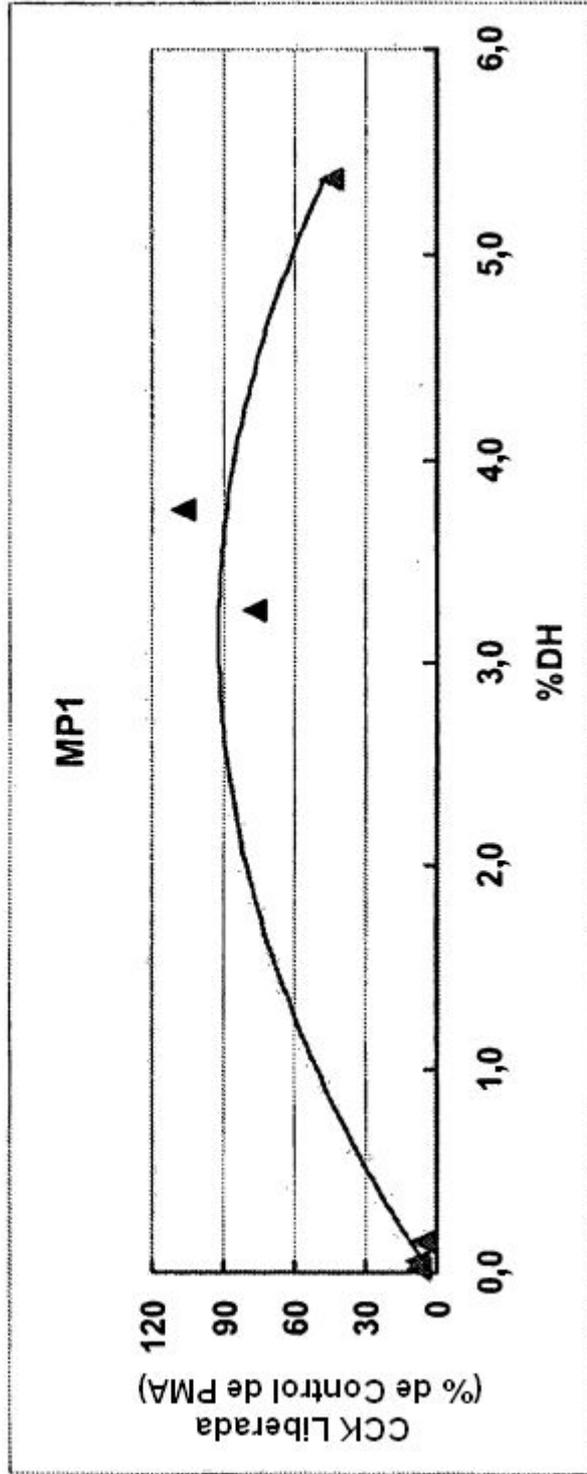


Figura 4G

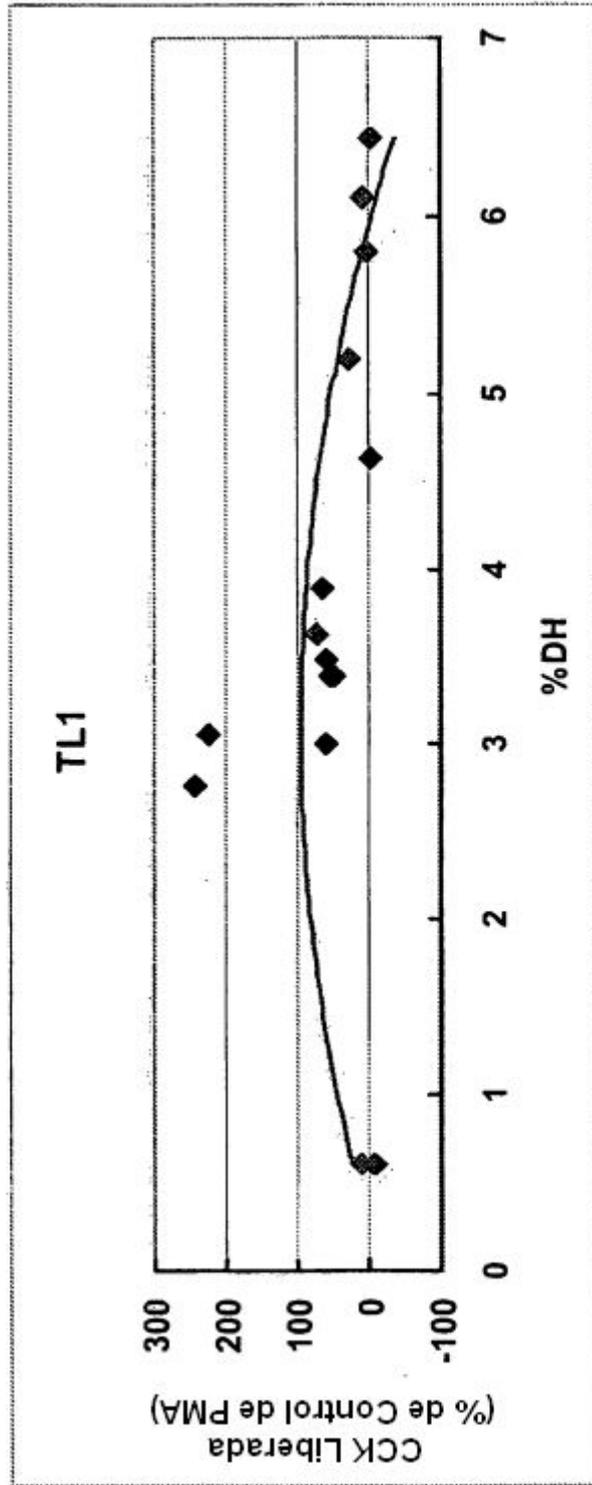


Figura 4H

