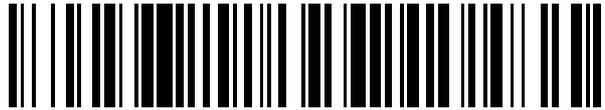


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 453**

51 Int. Cl.:

A23L 1/305	(2006.01)
C07K 5/083	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)
C07K 5/065	(2006.01)
C07K 5/072	(2006.01)
C07K 5/062	(2006.01)
C07K 5/068	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)
C12R 1/225	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2007 E 07708374 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 1992352**

54 Título: **Agente para uso en la profilaxis de la aterosclerosis**

30 Prioridad:

14.02.2006 JP 2006035945
14.02.2006 JP 2006035946

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2014

73 Titular/es:

CALPIS CO., LTD. (100.0%)
4-1, EBISU-MINAMI 2-CHOME, SHIBUYA-KU
TOKYO 150-0022, JP

72 Inventor/es:

HIROTA, TATSUHIKO;
NAKAMURA, TEPPEI;
OHKI, KOHJI;
MASUYAMA, AKIHIRO;
TAKANO, TOSHIAKI;
YOSHIKAWA, TOSHIKAZU;
NAITO, YUJI;
ICHIKAWA, HIROSHI y
AKAGIRI, SATOMI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 463 453 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

Agente para uso en la profilaxis de la aterosclerosis

La presente invención se refiere a un agente profiláctico para la arteriosclerosis, un inhibidor del engrosamiento de la túnica vascular íntima y un agente mejorador de la función del endotelio vascular que tienen un efecto de inhibición del engrosamiento de la túnica vascular íntima o de mejora de funciones del endotelio vascular, y de los que se espera que ejerzan un efecto anti-arteriosclerótico, así como a un alimento funcional que produce dichos efectos.

Las enfermedades ateroscleróticas, tales como el infarto de miocardio y el infarto cerebral, representan la mayor parte de las causas de muerte en Japón, junto con los cánceres. Los factores de riesgo para la arteriosclerosis incluyen hiperlipemia, hiperlipidemia, hipertensión, diabetes, hábito de fumar, obesidad, hiperuricemia, envejecimiento, estrés y similares, que están interrelacionados para causar una angiopatía. De este modo, incluso si cada factor de riesgo es pequeño, la acumulación de los factores aumenta aditiva y sinérgicamente el riesgo.

Se han identificado convencionalmente diversas funciones fisiológicas de la leche fermentada, las bacterias de ácido láctico y los productos de hidrólisis enzimática de la leche. Por ejemplo, en las Publicaciones 1 y 2 de Patente se presenta el efecto reductor del nivel de colesterol, en la Publicación 3 de Patente y la Publicación 1 de no Patente se presenta el efecto hipotensivo, y en la Publicación 4 de Patente se presenta el efecto antiestrés. En la Publicación 5 de Patente se describe que un producto de hidrólisis de caseína, que contiene aminoácidos libres y péptidos y ha sido obtenido al hidrolizar caseína de leche animal hasta que tiene una longitud media de cadena no superior a 2,1 en términos del número de restos de aminoácido, presenta una actividad inhibitoria de la enzima conversiva de angiotensina I o un efecto hipotensivo. Estas publicaciones proporcionan información relativa a la mitigación de cada factor de riesgo para la arteriosclerosis.

Por otro lado, se prevé que la mera mitigación de uno de los anteriores factores de riesgo no dé lugar a la prevención del inicio de la arteriosclerosis. Por ejemplo, en las Publicaciones 2 y 3 de no Patente se presenta la ausencia de interrelación entre el nivel sanguíneo de colesterol y el inicio de la arteriosclerosis, en la Publicación 4 de no Patente se enseña que la supresión de la hipertensión no cambia el grado de la arteriosclerosis, y en la Publicación 5 de no Patente se describe que la administración de un inhibidor (enalapril) de la enzima conversiva de angiotensina I no da lugar a un efecto inhibitorio de la arteriosclerosis.

En consecuencia, aun cuando se sabe que el particular producto de hidrólisis de caseína descrito en la Publicación 5 de Patente mitiga cada factor de riesgo para la arteriosclerosis, esto no significa que el particular producto de hidrólisis de caseína descrito tenga un efecto anti-arteriosclerótico.

Una arteria está esencialmente compuesta de la túnica adventicia, la túnica media que incluye la capa de músculo liso que causa que el vaso sanguíneo se dilate y se constriña, y la túnica íntima en contacto directo con la sangre y que incluye la capa de células endoteliales, que ordena a la capa de músculo liso de la túnica media. Se está revelando recientemente que las células endoteliales de la túnica íntima controlan diversas órdenes relativas a funciones vasculares, tales como la fibrinólisis y la coagulación de la sangre, la dilatación y constricción de vasos sanguíneos, la inhibición y el desarrollo de inflamación, y la proliferación y regresión de vasos sanguíneos. Se cree que las funciones del endotelio vascular están asociadas con la arteriosclerosis y otras diversas enfermedades. Por lo tanto, se espera que una mejora de las funciones del endotelio vascular pueda prevenir la arteriosclerosis.

La arteriosclerosis es una patología en que la pared arterial se engrosa hasta que se reduce su elasticidad. En particular, la aterosclerosis se caracteriza por un engrosamiento en forma de granos (ateroma) de la zona arterial subíntima y produce síntomas de flujo sanguíneo reducido o alterado. Se ha considerado recientemente que dichos síntomas se atribuyen a una lesión o una función disminuida de células del endotelio vascular.

Por lo tanto, se puede esperar que la inhibición del engrosamiento del endotelio vascular mitigue o evite el inicio de la aterosclerosis.

Se sabe que la medición diagnóstica de las funciones del endotelio vascular en un ser humano bajo condiciones no perjudiciales se lleva a cabo mediante pletismografía, como se describe en la Publicación 6 de no Patente. La pletismografía es un método para determinar las funciones de las células endoteliales a través de la capacidad de vasodilatación, utilizando el fenómeno de que, cuando el flujo de sangre arterial se detiene temporalmente, aumenta la cantidad de la sustancia vasodilatadora generada y liberada por las células endoteliales, lo que aumenta transitoriamente el flujo sanguíneo, y cuando las funciones endoteliales están deterioradas, disminuye la liberación de la sustancia vasodilatadora, lo que da lugar a un flujo sanguíneo reducido.

Publicación 1 de Patente: JP-2003-306436-A.

Publicación 2 de Patente: JP-2002-65203-A.

Publicación 3 de Patente: JP-2005-52090-A.

Publicación 4 de Patente: JP-10-45610-A.

Publicación 5 de Patente: WO 2005-102542-A.

Publicación 1 de no Patente: American Journal of Clinical Nutrition 64 (1996), páginas 767-771.

Publicación 2 de no Patente: Shoku no Kagaku 257 (1999), páginas 20-25.

Publicación 3 de no Patente: Atherosclerosis 151 (2000), páginas 501-508.

5 Publicación 4 de no Patente: Circulation 104 (2001), páginas 2391-2394.

Publicación 5 de no Patente: International Journal of Cardiology 81 (2001), páginas 107-115.

Publicación 6 de no Patente: The American Journal of Cardiology 87 (2001), páginas 121-125.

10 En el Documento JP 06 040 944 A se describe cómo obtener un inhibidor industrialmente eficaz de la enzima conversiva de angiotensina, capaz de presentar una excelente actividad inhibidora de la enzima conversiva de angiotensina mediante una pequeñísima cantidad por administración oral, producido de forma barata y fácilmente. El inhibidor de la enzima conversiva de angiotensina contiene, como un ingrediente activo, un péptido que contiene Val-Pro-Pro y que tiene un número de restos de aminoácido de 3-10. Este inhibidor se produce al someter una materia prima alimenticia que contiene un péptido compuesto de Val-Pro-Pro a un tratamiento de fermentación con bacterias de ácido láctico.

15 En el Documento WO 99 16862 A se describen una cepa de una bacteria láctica capaz de producir una gran cantidad de lactotripéptido, y un producto de leche fermentada que contiene diversos componentes que tienen actividades hipotensivas y relajantes del estrés y puede ser fácilmente tomado y tragado. Más específicamente, una bacteria láctica que pertenece al género *Lactobacillus helveticus*, es decir, la cepa CM4 de *Lactobacillus helveticus* (depositada bajo el número de acceso FERM PB-6060 con el National Institute of Bioscience and Human-
20 Technology), que se caracteriza por tener unas propiedades micológicas particulares, producir tripéptidos Val-Pro-Pro y/o Ile-Pro-Pro en una cantidad no inferior a 60 µg/ml en términos de Val-Pro-Pro cuando se cultiva en una leche animal que contiene no menos de 9% en peso (en términos de contenido de sólidos) de leche no grasa como medio, y presentar una actividad proteasa extracelular no inferior a 400 U/OD a 590; y un producto de leche fermentada, preparado al fermentar leche animal con la bacteria láctica anterior.

25 En el Documento WO 00 41572 A1 se describen procedimientos para producir leche fermentada y suero lácteo mediante los cuales se pueden obtener eficazmente, con elevado rendimiento, leche fermentada y suero lácteo que contienen un elevado contenido de un péptido ACEI, que son muy seguros y son utilizables como fármacos, alimentos funcionales, alimentos saludables, etcétera. Un procedimiento para preparar leche fermentada que contiene trozos de cuajada y suero lácteo que contiene un péptido inhibitorio de la enzima conversiva de
30 angiotensina, que implica la operación de mezclar y agitar con bacterias de ácido láctico un material que contiene leche para obtener un material mixto, y la operación de fermentar el material mixto bajo agitación para formar el suero lácteo que contiene el péptido inhibitorio de la enzima conversiva de angiotensina; y un procedimiento para producir suero lácteo que implica además la operación de centrifugar y/o filtrar con compresión la leche fermentada anteriormente obtenida, para separar y recoger de este modo el suero lácteo.

35 En el Documento JP 2003 513636 A se describe un procedimiento para preparar un producto que contiene péptidos antihipertensivos al fermentar con bacterias de ácido láctico un material de partida que contiene caseína. La invención también se refiere al producto obtenido y a su uso como un producto funcional tal cual es o como un ingrediente o aditivo de sustancias comestibles.

40 Bonithon-Kopp et al., *Circulation*, **1994**, 89 (3), 952-954, describen un estudio de casos y controles en que se examina la relación entre la actividad plasmática de la ACE y el grosor de las túnicas íntima-media de la pared de la carótida, medido ultrasonográficamente, en una población aparentemente sana.

45 A. Prasad et al., *Journal of the American College of Cardiology*, **1999**, 33 (3), 796-804, describen un estudio llevado a cabo para determinar si la inhibición de la enzima conversiva de angiotensina (ACE; del inglés, angiotensin converting enzyme) mejoraba la vasodilatación mediada por el flujo y dependiente del endotelio en pacientes con aterosclerosis o con sus factores de riesgo, y si esto era mediado por una actividad potenciada de la bradicinina.

50 En el Documento EP-A-1 016 709 se enseña un producto de leche fermentada que contiene bacterias de ácido láctico capaces de producir una gran cantidad de lactotripéptido y una gran cantidad de un ingrediente activo que tiene actividad hipotensiva y efecto antiestrés, y que puede ser agradablemente tomado en forma de alimento o bebida. Bacterias de ácido láctico de *Lactobacillus helveticus* que tienen propiedades bacteriológicas específicas, las bacterias, cuando se cultivan en un medio de leche animal que contiene un 9% de leche no grasa en peso de
55 sólidos, producen tripéptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro en una cantidad de 60 µg en términos de Val-Pro-Pro por mililitro de medio, y presentan una actividad proteinasa extracelular no inferior a 400 U/OD a 590. Cepa CM4 de *Lactobacillus helveticus* (depositada en el National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; número de depósito FERM BP-6060). Un producto de leche fermentada obtenido al fermentar una leche animal con estas bacterias de ácido láctico.

- 5 El Documento WO 2007/132054 A se refiere a la prevención y el tratamiento de una disfunción endotelial empleando péptidos biológicamente activos y productos que los contienen. En particular, se utilizan los tripéptidos Ile-Pro-Pro (IPP) y Val-Pro-Pro (VPP), o mezclas, productos de concentración u otros productos que los contienen. Un aspecto específico de la presente invención es potenciar la elasticidad de los vasos sanguíneos utilizando dichos péptidos biológicamente activos.
- En el Documento EP-A-0 162 032 se describe un nuevo péptido auricular que tiene unas actividades natriurética, diurética y vasodilatadora útiles.
- Un objeto de la presente invención es proporcionar un agente según la reivindicación 1.
- Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso según la reivindicación 11.
- 10 Descrito en esta memoria, se proporciona un agente que tiene al menos uno de un efecto mejorador de funciones del endotelio vascular y un efecto inhibitorio del engrosamiento de la túnica vascular íntima, agente que comprende, como un componente activo, un producto de hidrólisis de caseína de leche animal que contiene Xaa-Pro-Pro, o un concentrado del mismo.
- 15 Descrito en esta memoria, también se proporciona un agente que tiene al menos uno de un efecto mejorador de funciones del endotelio vascular y un efecto inhibitorio del engrosamiento de la túnica vascular íntima, agente que comprende Xaa-Pro-Pro como un componente activo.
- 20 De acuerdo con la presente invención, también se proporciona un agente para uso en la profilaxis de la aterosclerosis, agente que comprende, como un componente activo, un producto de fermentación que contiene Ile-Pro-Pro y/o Val-Pro-Pro, obtenido al fermentar un material de partida que comprende proteína láctea con una cepa bacteriana de la especie *Lactobacillus helveticus*.
- De acuerdo con la presente invención, se proporciona un agente profiláctico para la aterosclerosis que comprende cualquiera de los anteriores agentes como un componente activo.
- 25 De acuerdo con la presente invención, también se proporciona el uso de un producto de hidrólisis de caseína de leche animal que contiene Xaa-Pro-Pro o un producto de concentración del mismo, el uso de Xaa-Pro-Pro, o el uso de un producto de fermentación que contiene Ile-Pro-Pro y/o Val-Pro-Pro obtenido al fermentar un material de partida que comprende proteína láctea con una cepa bacteriana de la especie *Lactobacillus helveticus*, en la fabricación de un agente profiláctico para la aterosclerosis.
- 30 Al contener, como un componente activo, el producto de hidrólisis de caseína particular o un producto de concentración del mismo, Xaa-Pro-Pro, el producto de fermentación particular que contiene Ile-Pro-Pro y/o Val-Pro-Pro, o Xaa-Pro-Pro, el agente y el alimento funcional de acuerdo con la presente invención que tienen al menos uno de un efecto mejorador de funciones del endotelio vascular y un efecto inhibitorio del engrosamiento de la túnica vascular íntima, son excelentemente seguros, y, en particular, el alimento funcional puede ser tomado rutinariamente durante un periodo prolongado de tiempo. De esta manera, el agente y el alimento funcional presentes mejoran la hipertensión crónica o moderan la arteriosclerosis o el engrosamiento de la túnica vascular íntima, que están asociados con funciones del endotelio vascular, y, en particular, moderan la aterogénesis causada por funciones deprimidas o una lesión de células del endotelio vascular debidas al envejecimiento o el estilo de vida. En consecuencia, se puede esperar una mitigación o prevención del inicio de la aterosclerosis.
- 35 El agente anterior tiene un efecto profiláctico sobre la aterosclerosis.
- 40 La Figura 1 es un gráfico que muestra los resultados de una prueba confirmatoria para el efecto inhibitorio del engrosamiento de la túnica vascular íntima, llevada a cabo en el Ejemplo 2-1 y el Ejemplo Comparativo 2.
- Se explicará ahora la presente invención con más detalle.
- El agente y el alimento funcional que tienen al menos uno de un efecto mejorador de funciones del endotelio vascular y un efecto inhibitorio del engrosamiento de la túnica vascular íntima de acuerdo con la presente invención contienen, como un componente activo:
- 45 (a) Xaa-Pro-Pro, que incluye Ile-Pro-Pro y/o Val-Pro-Pro [al que se hace referencia más adelante como componente (a)];
- (b) un producto de hidrólisis de caseína de leche animal que contiene Xaa-Pro-Pro, que incluye Ile-Pro-Pro y/o Val-Pro-Pro, o un producto de concentración del mismo [a los que se hace referencia más adelante como componente (b)]; o
- 50 (c) un producto de fermentación que contiene Ile-Pro-Pro y/o Val-Pro-Pro, obtenido al fermentar un material de partida que contiene proteína láctea con una cepa bacteriana de la especie *Lactobacillus helveticus* [al que se hace referencia más adelante como componente (c)]. Es decir, los componentes (b) y (c) incluyen el componente (a).

Se prefiere que el componente (b) contenga además Xaa-Pro.

5 El contenido de Xaa-Pro-Pro en el componente (b) es normalmente no inferior al 1% en peso, preferiblemente del 1 al 5% en peso, de la cantidad total de los péptidos y los aminoácidos libres en el componente (b). Con el contenido no inferior al 1% en peso se puede esperar que se alcance un efecto aún más excelente. Además, los contenidos de Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro en el componente (b) pueden ser independiente o colectivamente no inferiores al 0,3% en peso de la cantidad total de los péptidos y los aminoácidos libres en el componente (b); en ambos casos se puede esperar un efecto excelente. Además, cuando los contenidos de Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro en el componente (b) son independientemente no inferiores al 0,3% en peso, se puede esperar un efecto aún más grande.

10 El contenido de Xaa-Pro en el componente (b) es normalmente no inferior al 5% en peso, preferiblemente del 5 al 25% en peso, de la cantidad total de los péptidos y los aminoácidos libres en el componente (b). Con el contenido no inferior al 5% en peso se puede esperar un efecto aún más excelente.

El contenido de Ile-Pro-Pro y/o Val-Pro-Pro en el componente (c) es no inferior a 10 mg, preferiblemente no inferior a 15 mg, por 100 g del producto de fermentación en forma liofilizada. Con este contenido se puede esperar el efecto deseado.

15 El Xaa de los Xaa-Pro-Pro y Xaa-Pro del componente (b) puede ser cualquier aminoácido. Por ejemplo, Xaa-Pro-Pro puede ser Ser-Pro-Pro o Leu-Pro-Pro además de Ile-Pro-Pro y/o Val-Pro-Pro, y Xaa-Pro puede ser Ile-Pro, Glu-Pro, Arg-Pro, Gln-Pro, Met-Pro o Tyr-Pro. El componente (b) puede ser preferiblemente un producto de hidrólisis de caseína que contenga además uno o dos o más de los Xaa-Pro anteriormente enumerados.

20 Los componentes (b) y (c) pueden contener aminoácidos libres además de los péptidos y pueden contener también, además de los péptidos y los aminoácidos libres, por ejemplo, lípido, ceniza, hidrocarburo, fibra dietética, humedad y similares, que están normalmente contenidos en la caseína de leche animal o la proteína láctea comercialmente asequibles. Parte de estos, o todos, pueden ser eliminados de cualquier componente adecuado, según se requiera.

25 Se puede preparar el componente (b), por ejemplo, al hidrolizar caseína de leche animal con un grupo de enzimas que proporcione Xaa-Pro-Pro (incluyendo Ile-Pro-Pro y/o Val-Pro-Pro) y opcionalmente Xaa-Pro, según se requiera, o al fermentar caseína de leche animal con mohos de "koji".

La caseína de leche animal es una proteína que se encuentra en alimentos o similares ricos en Pro, y tiene una seguridad confirmada. Los ejemplos de la caseína de leche animal pueden incluir caseínas de leche de vaca, leche de yegua, leche de cabra y leche de oveja, prefiriéndose la caseína de leche de vaca.

30 Al hidrolizar o fermentar la caseína de leche animal, la concentración de caseína no está particularmente limitada y puede ser preferiblemente de 3 a 19% en peso para una producción eficaz de componente (b).

El grupo de enzimas puede ser preferiblemente el Grupo (X) de enzimas que contiene, por ejemplo, una peptidasa que es capaz de escindir la secuencia Pro-Xaa del extremo carboxílico de Xaa-Pro-Xaa o Xaa-Pro-Pro-Xaa.

35 El Grupo (X) de enzimas puede incluir preferiblemente una serina proteinasa que tiene serina en su centro activo, o una metal proteinasa que tiene un metal en su centro activo. La metal proteinasa puede ser proteasa neutra I, proteasa neutra II, leucina aminopeptidasa o similar. Se prefiere que el Grupo (X) de enzimas contenga al menos una de estas metal proteinasas para obtener eficazmente el producto de hidrólisis deseado en poco tiempo en una reacción de una etapa. La peptidasa que es capaz de escindir la secuencia Pro-Xaa puede ser preferiblemente una enzima que tenga el punto isoeléctrico en la región ácida.

40 El grupo de enzimas o Grupo (X) de enzimas puede ser un grupo de enzimas procedente de mohos de koji, tal como de *Aspergillus oryzae*. Dicho grupo de enzimas se puede obtener al cultivar las células bacterianas en un medio adecuado y extraer con agua las enzimas producidas. Entre los grupos de enzimas procedentes de *Aspergillus oryzae*, se prefieren particularmente aquellos que tienen el punto isoeléctrico en la región ácida.

45 El grupo de enzimas procedente de *Aspergillus oryzae* puede ser un producto comercialmente asequible, tal como, por ejemplo, Sumizyme FP, LP o MP (todas marcas comerciales registradas, fabricados por SHIN NIHON CHEMICAL CO., LTD.), Umamizyme (marca comercial registrada, fabricado por AMANO ENZYME INC.), Sternzyme B11024 y PROHIDROXY AMPL (ambos nombres comerciales, fabricados por HIGUCHI INC.), Orientase ONS (marca comercial registrada, fabricado por HANKYU BIOINDUSTRY INC.), o Denazyme AP (marca comercial registrada, fabricado por NAGASE BIOCHEMICALS, LTD.), siendo particularmente preferido Sumizyme FP (marca comercial registrada, fabricado por SHIN NIHON CHEMICAL CO., LTD.).

50 Para el uso de estos productos comerciales se fijan normalmente unas condiciones óptimas, pero las condiciones, tales como la cantidad de enzimas utilizada y el tiempo de reacción, pueden ser adecuadamente ajustadas dependiendo del grupo de enzimas que se va a utilizar, con objeto de obtener el producto de hidrólisis de caseína anteriormente discutido.

La cantidad del grupo de enzimas utilizado para hidrolizar la caseína de leche animal puede ser aquélla para que,

por ejemplo, la relación ponderal entre el grupo de enzimas y la caseína de leche animal sea no inferior a 1/1000, preferiblemente de 1/1000 a 1/10, más preferiblemente de 1/100 a 1/10, aún más preferiblemente de 1/40 a 1/10, en una disolución acuosa de la caseína de leche animal.

5 Las condiciones de reacción pueden ser adecuadamente seleccionadas dependiendo del grupo de enzimas que se va a utilizar, con objeto de obtener el producto de hidrólisis de caseína objetivo. La temperatura puede ser normalmente de 25 a 60 °C, preferiblemente de 45 a 55 °C, y el pH es normalmente de 3 a 10, preferiblemente de 5 a 9, más preferiblemente de 5 a 8. La duración de la reacción enzimática es normalmente de 2 a 48 horas, preferiblemente de 7 a 15 horas.

10 La reacción enzimática puede ser terminada inactivando la enzima. Normalmente, la enzima se inactiva a una temperatura de 60 a 110 °C para terminar la reacción.

Después de la terminación de la reacción enzimática, se prefiere separar el precipitado resultante mediante centrifugación o diversas filtraciones, según se desee.

15 Además, los péptidos que tienen un sabor u olor amargo pueden ser separados del producto de hidrólisis resultante, según se desee. Tales componentes amargos u olorosos pueden ser separados usando carbono activado o resinas hidrófobas. Por ejemplo, la separación puede ser llevada a cabo añadiendo al producto de hidrólisis obtenido de 1 a 20% en peso de carbono activado con respecto a la cantidad de caseína utilizada y dejando transcurrir la reacción durante un periodo de 1 a 10 horas. Después de su uso, el carbono activado puede ser separado mediante un método convencional, tal como una operación de centrifugación o de procesamiento por membrana.

20 El líquido de reacción que contiene el componente (b) resultante puede ser añadido tal cual está a un producto líquido, tal como una bebida, para producir un alimento funcional. Alternativamente, con objeto de mejorar la versatilidad del producto de hidrólisis de caseína del componente (b), se prefiere concentrar y secar el líquido de reacción hasta un polvo. Al convertirlo en un polvo, el líquido de reacción que contiene el componente (b) puede ser convertido en un agente que imparte funcionalidad, que imparte un efecto profiláctico sobre la aterosclerosis.

25 Para mejorar el equilibrio nutricional, el gusto, el sabor o similar, se pueden añadir diversos aditivos auxiliares al polvo, tales como diversos hidrocarburos, lípidos, vitaminas, minerales, edulcorantes, agentes saboreadores, agentes colorantes o agentes mejoradores de la textura.

30 La dosis del agente que tiene el efecto de mejorar las funciones del endotelio vascular y/o inhibir el engrosamiento de la túnica vascular íntima, cuando el componente (b) es el componente activo, es normalmente de 10 µg a 10 g, preferiblemente de 1 mg a 5 g, más preferiblemente de aproximadamente 3 mg a 1 g, al día para un ser humano en términos de Xaa-Pro-Pro o del total de Xaa-Pro-Pro y Xaa-Pro en el componente (b). La dosis puede ser administrada en varias dosis divididas al día.

El período de administración puede ser ajustado en cuanto a los síntomas de una enfermedad, y es normalmente un día o más, preferiblemente de 7 a 365 días. Se prefiere una ingestión regular.

35 La cepa bacteriana de la especie *Lactobacillus helveticus* usada en la preparación del componente (c) es una sola cepa de esta especie. Sin embargo, en la fermentación, se pueden emplear opcionalmente otras bacterias de ácido láctico con tal de que el efecto deseado de la presente invención no resulte afectado.

40 La cepa bacteriana de la especie *Lactobacillus helveticus* puede ser preferiblemente una cepa que tenga una elevada actividad proteínasa extracelular, que es preferida como bacteria capaz de producir con elevado rendimiento Ile-Pro-Pro y/o Val-Pro-Pro, que tienen los efectos de profilaxis de la aterosclerosis. Por ejemplo, se prefieren las cepas que tienen un valor de U/OD a 590 no inferior a 400, según se mide de acuerdo con el método de Yamamoto et al. [N. Yamamoto et al., J. Biochem. 114, 740 (1993)], basado en el método de Twining et al. [S. Twining, Anal. Biochem. 143, 3410 (1984)].

45 Un ejemplo preferido de la cepa de *Lactobacillus helveticus* puede ser la cepa CM4 de *Lactobacillus helveticus* (depositada en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón, bajo el número de acceso FERM BP-6060 el 15 de agosto de 1997) (a la que más adelante se hace referencia como cepa CM4). La cepa CM4 ha sido depositada bajo el número de acceso anteriormente mencionado, bajo el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con Fines de Procedimiento de Patente, y ya ha sido patentada.

50 Se puede preparar el componente (c) añadiendo un iniciador de leche fermentada que contiene una cepa bacteriana de la especie *Lactobacillus helveticus* a un material de partida que contiene proteína láctea, y dejando que fermente el mismo bajo unas condiciones adecuadamente seleccionadas, tal como la temperatura de fermentación.

El componente (c), como un componente activo, puede incluir un producto pulverulento preparado, por ejemplo, al liofilizar o secar por pulverización un producto de concentración del componente (c) obtenido.

La cepa bacteriana de la especie *Lactobacillus helveticus* puede estar preferiblemente en forma de un iniciador precultivado que tenga una actividad suficientemente elevada. Preferiblemente, el recuento celular inicial puede ser aproximadamente 10^5 - 10^9 células/ml.

5 Para uso en la fabricación de, por ejemplo, un alimento y una bebida funcionales, tales como alimentos para usos saludables especificados, el componente (c) puede ser preparado por cofermentación con la cepa de la especie *Lactobacillus helveticus* y una levadura para obtener el producto resultante con un gusto y un sabor y también una sabrosura mejorados. La cepa de la levadura no está particularmente limitada y puede ser preferiblemente, por ejemplo, una levadura del género *Saccharomyces*, tal como *Saccharomyces cerevisiae*. El contenido de la levadura puede ser adecuadamente seleccionado según la finalidad.

10 El material de partida que contiene proteína láctea puede ser, por ejemplo, leches animales, tales como leche de vaca, leche de yegua, leche de oveja y leche de cabra; leches vegetales, tal como leche de soja; y leches procesadas de las mismas, tales como leche desnatada, leche reconstituida, leche en polvo y leche condensada. Entre éstas, se prefieren la leche de vaca, la leche de soja, y leche procesada de las mismas, y se prefieren particularmente la leche de vaca y leche procesada de la misma.

15 El contenido de sólidos de la leche no está particularmente limitado y, cuando se utiliza leche desnatada, el contenido de materia sólida no grasa es normalmente de aproximadamente 3 a 15% en peso, y preferiblemente de 6 a 15% en peso, para una buena productividad.

20 La fermentación se puede llevar normalmente a cabo bajo agitación o bajo condiciones estáticas, por ejemplo, a una temperatura de 25 a 45 °C, preferiblemente de 30 a 45 °C, durante un periodo de 3 a 72 horas, preferiblemente de 12 a 36 horas, y se detiene cuando la acidez de ácido láctico alcanza 1,5% o más.

25 La dosis del agente que tiene el efecto de mejorar funciones del endotelio vascular y/o inhibir el engrosamiento de la túnica vascular íntima, cuando el componente (c) es el componente activo, es normalmente de 1 a 100 g, preferiblemente de aproximadamente 2 a 50 g, al día para un ser humano en términos del producto secado de componente (c), y se puede administrar en varias dosis divididas al día. En términos de Val-Pro-Pro y/o Ile-Pro-Pro, la dosis es normalmente de 10 µg a 10 g, preferiblemente de 1 mg a 5 g, más preferiblemente de aproximadamente 3 mg a 1 g, y se puede administrar en varias dosis divididas al día.

El período de administración puede ser ajustado en cuanto a los síntomas de una enfermedad, y es normalmente un día o más, preferiblemente de 7 a 365 días. Se prefiere una ingestión regular.

30 Un agente profiláctico para la arteriosclerosis descrito en esta memoria contiene un agente que tiene el efecto de mejorar funciones del endotelio vascular y/o inhibir el engrosamiento de la túnica vascular íntima. En particular, cuando el agente presenta un efecto inhibitorio sobre el engrosamiento de la túnica vascular íntima, el agente profiláctico es útil como un agente profiláctico para la aterosclerosis según se reivindica.

35 La dosis del agente profiláctico para la aterosclerosis de acuerdo con la presente invención es normalmente de 10 µg a 10 g, preferiblemente de 1 mg a 5 g, más preferiblemente de aproximadamente 3 mg a 1 g, al día para un ser humano en términos de Xaa-Pro-Pro (incluyendo Ile-Pro-Pro y/o Val-Pro-Pro), el total de Xaa-Pro-Pro (incluyendo Ile-Pro-Pro y/o Val-Pro-Pro) y Xaa-Pro, o Val-Pro-Pro y/o Ile-Pro-Pro en los componentes (a) a (c). La dosis se puede administrar en varias dosis divididas al día.

40 El período de administración del agente profiláctico para la aterosclerosis puede ser ajustado teniendo en cuenta la edad del ser humano o animal al que se va a administrar el agente profiláctico, o el entorno del ser humano o animal asociado con los factores de riesgo para la aterosclerosis. El periodo es normalmente un día o más, preferiblemente de 7 a 365 días, y se prefiere una ingestión regular.

Normalmente, el agente profiláctico para la aterosclerosis de acuerdo con la presente invención se administra oralmente.

45 Los agentes de la presente invención pueden ser formulados para administración oral. Por ejemplo, los agentes pueden estar en forma de tabletas, píldoras, cápsulas duras, cápsulas blandas, microcápsulas, polvos, gránulos o líquido.

50 Los presentes agentes pueden ser formulados con, por ejemplo, un vehículo, un agente adyuvante, un excipiente, un excipiente auxiliar, un antiséptico, un estabilizante, un aglutinante, un agente regulador del pH, un tampón, un agente espesativo, un agente gelatinizante, un conservante, un antioxidante, o similar, que sean aceptables para uso farmacéutico, y pueden ser fabricados en una forma de dosificación unitaria que sea requerida en una formulación generalmente aprobada.

El uso de la reivindicación 11 puede ser para producir alimentos saludables, tales como alimentos para usos saludables especificados que reivindican el efecto de profilaxis de la aterosclerosis.

El uso puede ser para fabricar un alimento funcional que pueda ser tomado regularmente, y pueda ser tomado

continua o intermitentemente durante un largo periodo de tiempo, y, por lo tanto, la ingestión del alimento funcional para obtener dicho efecto es normalmente de 10 µg a 10 g, preferiblemente de 1 mg a 5 g, más preferiblemente de aproximadamente 3 mg a 1 g, al día para un ser humano en términos de Xaa-Pro-Pro (incluyendo Val-Pro-Pro y/o Ile-Pro-Pro) o del total de Xaa-Pro-Pro (incluyendo Val-Pro-Pro y/o Ile-Pro-Pro) y Xaa-Pro en el componente (b), o de Val-Pro-Pro y/o Ile-Pro-Pro en el componente (c). La ingestión individual del alimento funcional puede ser inferior a la cantidad anterior, dependiendo del número de ingestiones al día.

El período para tomar el alimento funcional descrito en esta memoria no está particularmente limitado, y se prefiere tomarlo durante un periodo prolongado de tiempo. Con objeto de obtener el efecto anteriormente discutido, el período de ingestión es normalmente un día o más, particularmente de 7 a 365 días, y se prefiere una ingestión regular.

El alimento funcional descrito en esta memoria, además del componente activo, el componente (b) o (c), puede contener opcionalmente aditivos, tales como productos de fermentación con bacterias de ácido láctico distintas de *Lactobacillus helveticus*, u otros componentes utilizados en alimentos y bebidas, tales como, por ejemplo, azúcares, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, agentes saboreadores, y mezclas de los mismos.

El alimento funcional descrito en esta memoria puede ser preparado en cualquier forma, tal como en forma de sólido, gel o líquido, añadiendo el componente (b) o (c) tal como está o en forma pulverulenta o granular a diversos alimentos y bebidas. Por ejemplo, el presente alimento funcional puede estar en forma de productos de leche fermentada, tales como bebidas con bacterias de ácido láctico, diversos alimentos y bebidas procesados, polvos secos, tabletas, cápsulas y gránulos, así como diversas bebidas, yogur, dieta fluida, gelatina, golosinas, alimento esterilizado en envase flexible, golosinas en forma de tableta, galletas, bizcochos, panes, galletas saladas o chocolates.

La presente invención será ahora explicada con más detalle con referencia a Ejemplos, Ejemplos Analíticos y Ejemplos Comparativos, que son sólo ilustrativos y no limitan la presente invención.

Ejemplo 1 de Producción

Se añadió 1 g de caseína procedente de leche de vaca [fabricada por NIPPON NZMP (Japón) LTD.] a 99 g de agua destilada con una temperatura ajustada a aproximadamente 80 °C y se agitó a fondo la mezcla resultante. Se ajustó el pH de la mezcla a 7,0 con una disolución 1 N de hidróxido sódico (fabricada por WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) y se ajustó la temperatura a 20 °C, para preparar una disolución de sustrato.

A esta disolución de sustrato se añadió una enzima comercialmente asequible (Sumizyme FP, marca comercial registrada, fabricada por SHIN NIHON CHEMICAL CO., LTD.), que procede de *Aspergillus oryzae* y contiene al menos metal proteasa, serina proteasa, proteasa neutra I, proteasa neutra II y leucina aminopeptidasa, en una relación de enzima/caseína de 1/25 en peso, y se dejó reaccionar la mezcla resultante a 50 °C durante 14 horas. Luego se trató el producto de reacción en una autoclave a 110 °C durante 10 minutos para inactivar la enzima, obteniéndose de este modo una disolución de un producto de hidrólisis enzimática de caseína. La disolución de producto de hidrólisis enzimática fue secada en un secador por pulverización para preparar un polvo.

Se analizó la composición del polvo resultante. Se determinó el contenido de proteínas mediante el método Kjeldahl y se determinó el contenido de aminoácidos con un analizador de aminoácidos. Se calculó el contenido de péptidos restando el contenido de aminoácidos del contenido de proteínas. Además, se determinó el contenido de lípidos mediante el método de la hidrólisis ácida, el contenido de cenizas mediante el método de la conversión directa en cenizas, y el contenido de humedad mediante el método de la estufa con aire forzado. Se tomó el contenido de hidrocarburos como lo que queda después de restar de 100% los contenidos de estos componentes. Como resultado, se determinó que el contenido de aminoácidos era 35,8% en peso, el contenido de péptidos 45,7% en peso, el contenido de humedad 6,6% en peso, el contenido de lípidos 0,2% en peso, el contenido de cenizas 4,1% en peso, y el contenido de hidrocarburos 7,6% en peso.

Determinación de los aminoácidos constitutivos de péptidos

El polvo anteriormente preparado fue disuelto en una cantidad adecuada de agua destilada y fue analizado en un secuenciador automatizado de proteínas (nombre comercial PPSQ-10, fabricado por SHIMADZU CORPORATION) en cuanto a la secuencia de aminoácidos desde el extremo N. Por cierto, el analizador automático de péptidos no detecta aminoácidos libres.

La cantidad total de los aminoácidos en el resto 5 era 120 picomoles, y la cantidad total de los aminoácidos en el resto 6 era 100 picomoles. A partir de estos resultados, se halló que la mayoría de los péptidos contenidos en el polvo eran dipéptidos y tripéptidos. Además, el porcentaje de los péptidos que tenían Pro en el resto 2 era 49,5%, lo que era acusadamente elevado, y el porcentaje de los péptidos que tenían Pro en el resto 3 era también tan elevado como 29,8%.

En consecuencia, se estima que el contenido de Xaa-Pro o Xaa-Pro-Pro en el polvo es elevado y que estos péptidos presentan una elevada resistencia a la hidrólisis enzimática por proteasas en el organismo vivo.

Determinación de péptidos en el producto de hidrólisis enzimática

Se midieron los contenidos de los dipéptidos y tripéptidos mostrados en la Tabla 1 en el producto pulverulento de hidrólisis enzimática anteriormente obtenido, de acuerdo con un método rutinario usando diversos péptidos patrón químicamente sintetizados. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

5

Tabla 1

Secuencia peptídica	Concentración (µg/ml) en 10 mg/ml de polvo
Ile-Pro	16,0
Glu-Pro	7,1
Arg- Pro	10,3
Gln- Pro	34,5
Met- Pro	18,4
Tyr- Pro	128,9
Otro Xaa- Pro	299,4
Ser-Pro-Pro	2,9
Val-Pro-Pro	29,5
Ile-Pro-Pro	28,1
Phe-Pro-Pro	27,2
Otro Xaa-Pro-Pro	28,8

El contenido de los péptidos y los aminoácidos libres en una disolución del polvo en agua destilada era 8,15 mg/ml, el contenido de péptidos era 4,57 mg/ml, y el contenido de Xaa-Pro en los péptidos era 514,5 µg. Se confirmó que el porcentaje de Xaa-Pro en el polvo con respecto a la cantidad total de los péptidos y los aminoácidos libres era 6,3% en peso. Además, el contenido de Xaa-Pro-Pro en los péptidos era 116,5 µg. Se confirmó que el porcentaje de Xaa-Pro-Pro en el polvo con respecto a la cantidad total de los péptidos y los aminoácidos libres era 1,4% en peso.

10

Ejemplo 1-1

Se llevó a cabo una prueba para el efecto del producto de hidrólisis de caseína preparado en el Ejemplo 1 de Producción para mejorar funciones del endotelio vascular, sobre dos grupos de varones adultos de 40 a 65 años de edad que tenían una presión sanguínea sistólica de 140 a 159 mm Hg o una presión sanguínea diastólica de 90 a 99 mm Hg, con 24 individuos por grupo. La prueba se llevó a cabo como un estudio cruzado a doble ciego entre los dos grupos, a los que se administró diariamente durante 7 días, en el desayuno o en un plazo de 30 minutos tras el desayuno, 1,25 g del producto pulverulento de hidrólisis de caseína preparado en el Ejemplo 1 de Producción en una cápsula, como un alimento objetivo, o 1,25 g de polvo de caseinato sódico en una cápsula, como un placebo.

15

En la prueba, se midió el flujo de sangre en la arteria del antebrazo en reposo y tras la liberación de un torniquete, antes de la ingestión del alimento objetivo o el placebo y después de la ingestión durante siete días, usando un pletismógrafo EC6 fabricado por Primetech Co. Los resultados se muestran en la Tabla 2 como medias de cada grupo.

20

Tabla 2

	Alimento de prueba	Antes de la ingestión	Después de la ingestión
Flujo (A) de sangre arterial (ml/min/100 ml de tejido)	Alimento objetivo	3,4 ± 1,1	3,1 ± 0,8
	Placebo	3,4 ± 1,3	3,3 ± 1,2
Flujo máximo (B) de sangre (ml/min/100 ml de tejido)	Alimento objetivo	21,5 ± 8,3	30,0 ± 10,4
	Placebo	21,5 ± 7,1	20,8 ± 6,7
(B) / (A) x 100 (% de FBF)	Alimento objetivo	674,2 ± 268,5	1017,0 ± 390,3
	Placebo	689,3 ± 304,5	673,9 ± 266,0

25

En la Tabla 2, cada valor es la media de los 24 individuos ± la desviación estándar, y FBF (del inglés, forearm blood flow) representa el flujo de sangre en el antebrazo.

La diferencia en el flujo máximo de sangre y en (B) / (A) x 100 entre el grupo de alimento objetivo y el grupo de placebo fue significativa (p < 0,001). La diferencia en el flujo máximo de sangre y en (B) / (A) x 100 del grupo de

alimento objetivo entre antes y después de la ingestión fue significativa ($p < 0,001$).

Como se muestra en la Tabla 2, no se observó diferencia significativa alguna en el flujo de sangre arterial del antebrazo en reposo entre el grupo de alimento objetivo y el grupo de placebo, ni antes ni después de la ingestión.

5 Por otro lado, antes de la ingestión, no se observó diferencia significativa alguna en el flujo máximo de sangre tras la liberación del torniquete entre los dos grupos, pero, después de la ingestión, el flujo máximo de sangre fue significativamente mayor en el grupo de alimento objetivo en comparación con el valor antes de la ingestión o con el valor del grupo de placebo (ambos con $p < 0,001$ mediante la prueba t).

10 En la relación entre el flujo máximo de sangre después de una hiperemia reactiva y el flujo de sangre en reposo, no se observó diferencia significativa alguna antes de la ingestión entre los dos grupos, pero la relación fue significativamente mayor en el grupo de alimento objetivo después de la ingestión en comparación con el valor antes de la ingestión o con el valor del grupo de placebo (ambos con $p < 0,001$ mediante la prueba t). Por cierto, no se observó mejora significativa alguna en la presión sanguínea durante el periodo de prueba.

15 Mediante los resultados anteriormente discutidos, se demostró que el producto de hidrólisis de caseína preparado en el Ejemplo 1 de Producción presentaba, a través de su administración, un notable efecto de mejora en la evaluación fisiológica de funciones del endotelio vascular por pletismografía, y se confirmó dicho producto de hidrólisis como un agente eficaz para mejorar funciones del endotelio vascular. También se confirmó que este efecto de mejora no estaba relacionado con un efecto hipotensivo.

20 Se administró oralmente, mediante pulverización, 0,3 mg de nitroglicerina a los sujetos de prueba de cada grupo. Más tarde, se observó la respuesta del vasodilatador independiente del endotelio al NO exógeno a lo largo de 10 minutos y se tomó como medida el flujo máximo de sangre durante el periodo. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

	Alimento de prueba	Antes de la ingestión	Después de la ingestión
Respuesta (E) del vasodilatador independiente del endotelio (ml/min/100 ml de tejido)	Alimento objetivo	5,7 ± 1,7	5,9 ± 1,7
	Placebo	5,9 ± 2,3	6,0 ± 1,8
(E) / (A) x 100 (% de FBF)	Alimento objetivo	173,7 ± 36,2	193,9 ± 44,5
	Placebo	175,8 ± 43,5	187,6 ± 49,6

25 En la Tabla 3, cada valor es la media de los 24 individuos de cada grupo ± la desviación estándar, y FBF representa el flujo de sangre en el antebrazo.

Como se muestra en la Tabla 3, no se observó diferencia significativa alguna en la respuesta del vasodilatador independiente del endotelio entre antes y después de la ingestión en cada grupo, ni tampoco entre los dos grupos. Se obtuvieron resultados similares en la relación entre la respuesta del vasodilatador independiente del endotelio y el flujo de sangre en reposo.

30 Mediante los resultados anteriormente discutidos, se demostró que el efecto de mejora del producto de hidrólisis de caseína preparado en el Ejemplo 1 de Producción sobre el flujo de sangre reactivo era independiente de la mejora de las funciones del medio, que responde a NO, y se confirmó que era un reflejo directo de la mejora en funciones del endotelio vascular.

Ejemplo de Síntesis

35 Se sintetizaron Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro a través de la siguiente síntesis química orgánica mediante el método de la fase sólida en un sintetizador peptídico automatizado (PSSM-8) fabricado por SHIMADZU CORPORATION.

40 Como soporte en fase sólida se usaron 50 mg de resina de 2-clorotritil-poliestireno a la que se unió prolina que tenía su grupo amino protegido con un grupo fluorenilmetiloxycarbonilo (abreviado Fmoc en lo sucesivo) (resina SynProPep, marca comercial registrada, fabricada por SHIMADZU CORPORATION). Se hicieron reaccionar secuencialmente 100 micromoles de cada uno de Fmoc-Ile, Fmoc-Pro y Fmoc-Val, cuyos grupos amino estaban protegidos con el grupo Fmoc, mediante un método rutinario de acuerdo con la secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada, para obtener una resina con péptido unido.

45 La resina con péptido unido fue suspendida en 1 ml del líquido A de reacción (10% en volumen de ácido acético, 10% en volumen de trifluoroetanol y 80% en volumen de diclorometano), hecha reaccionar a temperatura ambiental durante un periodo de 30 a 60 minutos para escindir los péptidos de la resina, y filtrada a través de un filtro de vidrio. Se separó el disolvente del filtrado resultante bajo presión reducida y se añadió inmediatamente 1 ml del líquido B de

reacción (82,5% en volumen de ácido trifluoroacético, 3% en volumen de sulfuro de etilo y metilo, 5% en volumen de agua purificada, 5% en volumen de tioanisol, 2,5% en volumen de etanoditiol y 2% en volumen de tiofenol). La mezcla resultante fue dejada reaccionar a temperatura ambiental durante 6 horas para separar los grupos protectores de cadenas laterales, a la que se añadieron 10 ml de éter anhidro para que precipitaran los péptidos. El precipitado fue separado por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos, lavado varias veces con éter anhidro, y secado pulverizando nitrógeno gaseoso. Todos los péptidos sintetizados crudos así obtenidos fueron disueltos en 2 ml de una disolución acuosa 0,1 N de ácido clorhídrico y fueron purificados mediante HPLC en fase inversa C18 bajo las condiciones siguientes:

Bomba: bomba inteligente modelo L6200 (fabricada por HITACHI, LTD.); Detector: se detectó la absorción ultravioleta a 215 nm con el detector UV modelo L4000 (fabricado por HITACHI, LTD.); Columna: μ Bondasphere 5 μ C18 (fabricada por Nihon Waters K.K.); Eluyente: Líquido A de una disolución acuosa de TFA al 0,1% en peso, y Líquido B de acetonitrilo que contenía TFA al 0,1% en peso, (B/A+B) x 100 (%): de 0 a 40% (a lo largo de 60 minutos); Caudal: 1 ml/min.

La fracción eluida que tenía la máxima absorción fue recogida y liofilizada para obtener los péptidos sintetizados objetivos Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro con unas producciones de 5,7 mg y 6,5 mg, respectivamente. Los péptidos purificados fueron analizados desde el extremo N en un secuenciador de proteínas automatizado (modelo PPSQ-10, fabricado por SHIMADZU CORPORATION) y fueron adicionalmente analizados en un analizador de aminoácidos (modelo 800 Series, fabricado por JASCO CORPORATION). Se confirmó que los péptidos habían sido preparados del modo previsto.

Ejemplo 1-2

Se dejó que ratas Wistar (machos de 7 semanas de edad) se aclimataran durante una semana como animales de prueba. Se disolvió un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, hidrocloreuro del éster metílico de NG-nitro-L-arginina (L-NAME, fabricado por SIGMA-ALDRICH CORP.) en agua potable en una concentración de 1 g/l y, similarmente, L-NAME y el péptido Val-Pro-Pro anteriormente sintetizado, en unas concentraciones de 1 g/l y 0,3 g/l, respectivamente, y L-NAME y el péptido Ile-Pro-Pro anteriormente sintetizado, en unas concentraciones de 1 g/l y 0,3 g/l, respectivamente. Se dejó que las ratas accedieran libremente durante una semana al agua potable preparada. Como un testigo, se administró a un grupo de no tratamiento sólo el agua potable sin L-NAME disuelto en ella.

A continuación, se sometieron las ratas a exsanguinación letal bajo anestesia por éter dietílico. La aorta torácica fue extraída, reducida a una longitud de 2 mm y convertida en un anillo aórtico. Se ajustó el anillo en un aparato Magnus (nombre del producto: "Micro Tissue Organ Bath MTOB-1Z", fabricado por LABO SUPPORT CO., LTD.) lleno con 5 ml de disolución de Tyrode (composición: NaCl 158,3 mM, KCl 4,0 mM, CaCl₂ 2,0 mM, MgCl₂ 1,05 mM, NaH₂PO₄ 0,42 mM, NaHCO₃ 10,0 mM y glucosa 5,6 mM; pH de 7,4; 37 \pm 0,5 °C) y se dejó que se equilibrara con la tensión de reposo de 2,0 g. Luego se dejó que el anillo aórtico se constriñera con fenilefrina 1 μ M. Las muestras establemente constreñidas fueron observadas en cuanto a una respuesta de vasodilatador dependiente del endotelio usando acetilcolina 10 μ M. Se determinó el grado de vasodilatación por la respuesta como una relación con respecto a la constricción con fenilefrina 1 μ M. Los resultados se muestran en la Tabla 4. En la tabla, cada valor es una media de cada grupo de 8 animales.

Ejemplo Comparativo 1

Se midió el grado de vasodilatación por la respuesta de vasodilatación de la misma manera que en el Ejemplo 1-2 salvo por que el péptido Val-Pro-Pro o Ile-Pro-Pro fue sustituido por un inhibidor de la enzima conversiva de angiotensina I (ACE), enalapril, para un acceso libre a la concentración de 0,5 mg/l, que presentaba una actividad inhibitoria comparable a la de Val-Pro-Pro o Ile-Pro-Pro. Los resultados se muestran en la Tabla 4. En la tabla, cada valor es una media de cada grupo de 9 animales.

Tabla 4

Sustancia de prueba	Grado de vasodilatación (%)
L-NAME	26,1
L-NAME + Val-Pro-Pro	43,1*
L-NAME + Ile-Pro-Pro	36,8*
L-NAME + enalapril	31,6
Sin tratamiento	92,4*

*: p < 0,05

Los resultados de la Tabla 4 muestran que el grado de vasodilatación era significativamente mayor en los grupos que habían recibido Val-Pro-Pro o Ile-Pro-Pro junto con L-NAME que en el grupo que sólo había recibido L-NAME, lo

que indica que Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro mejoran funciones del endotelio vascular. Por otra parte, en el Ejemplo Comparativo 1, en donde se administró enalapril, que tiene una actividad inhibitoria de ACE, no se observó diferencia significativa alguna de vasodilatación en comparación con el grupo que sólo había recibido L-NAME. De este modo se demostró que una sustancia que tiene una actividad inhibitoria de ACE no mejora necesariamente funciones del endotelio vascular.

Ejemplo 2-1

Preparación de pienso de leche fermentada con CM4

Una leche desnatada comercialmente asequible fue disuelta en agua destilada hasta un contenido de sólidos de 9% (peso/peso), sometida a pasteurización a alta temperatura en una autoclave a 105 °C durante 10 minutos, y enfiada a la temperatura ambiental. A continuación, se inoculó en la disolución un 3% (volumen/peso) de un líquido para fermentación de iniciador de cepa CM4 (recuento celular de 5×10^8 células/ml) y se llevó a cabo la fermentación bajo condiciones estáticas a 37 °C durante 24 horas para obtener una leche fermentada con CM4.

La leche fermentada con CM4 así obtenida fue pasteurizada a 80 °C y fue liofilizada para obtener un polvo. El polvo liofilizado fue mezclado con un pienso en polvo comercialmente asequible (nombre comercial "CE-2", fabricado por CLEA JAPAN, INC.) en una relación de 10:90 en masa para preparar un pienso sólido al que se hace referencia como pienso de leche fermentada con CM4. Este pienso contenía Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro procedentes de la leche fermentada con CM4, en unas cantidades de 34,1 mg/kg y 17,1 mg/kg, respectivamente.

Prueba confirmatoria para el efecto de inhibición del engrosamiento de la túnica vascular íntima, independiente de la mejora de los lípidos sanguíneos

Se criaron preliminarmente durante una semana ratones con ApoE inactivada (machos de 5 semanas de edad) y luego se les dejó acceso libre durante 31 semanas al pienso de leche fermentada con CM4 anteriormente preparado o a un pienso sólido, como un pienso testigo, preparado a partir de un pienso en polvo comercialmente asequible (nombre comercial "CE-2", fabricado por CLEA JAPAN, INC.) que no contenía el polvo liofilizado de la leche fermentada con CM4 (5 animales en cada grupo).

Después de las ingestiones, se recogió transcárdiacamente sangre de los ratones y se sometió la misma a pruebas bioquímicas para determinar los niveles de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Se extrajo la aorta torácica de los ratones y se tiñó con hematoxilina-eosina para calcular la relación de las áreas íntima/media. Los resultados se muestran en la Figura 1 en un gráfico.

Ejemplo Comparativo 2

Una leche desnatada comercialmente asequible fue disuelta en agua destilada hasta un contenido de sólidos de 9% (peso/peso), sometida a pasteurización a alta temperatura en una autoclave a 105 °C durante 10 minutos, y enfiada a la temperatura ambiental. Se añadió ácido láctico a la disolución con el fin de proporcionar una acidez comparable a la de la leche fermentada con CM4 preparada en el Ejemplo 2-1 (2,3%), para preparar una leche no fermentada.

La leche no fermentada así obtenida fue pasteurizada a 80 °C y fue liofilizada para obtener un polvo. El polvo liofilizado fue mezclado con un pienso en polvo comercialmente asequible (nombre comercial "CE-2", fabricado por CLEA JAPAN, INC.) en una relación de 10:90 en masa para preparar un pienso sólido al que se hace referencia como pienso de leche no fermentada. El pienso de leche no fermentada no contenía Xaa-Pro-Pro ni Xaa-Pro.

Se administró el pienso de leche no fermentada a los ratones del mismo modo que en el Ejemplo 2-1 y se llevaron a cabo las pruebas bioquímicas y el cálculo de la relación de las áreas íntima/media vasculares de la misma manera que en el Ejemplo 2-1. Los resultados se muestran en la Tabla 5 y la Figura 1.

Tabla 5

	Colesterol total (mg/dl)		LDL-colesterol (mg/dl)		HDL-colesterol (mg/dl)		Triglicéridos (mg/dl)	
	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE
Testigo	678,6	37,1	544,8	42,7	332,7	22,7	91,2	17,0
Ej. Comp. 2	632,0	12,2	429,7	80,7	315,1	5,5	79,0	15,1
Ej. 2-1	610,2	49,1	485,2	43,0	289,4	11,8	111,4	9,3

Los resultados de la Tabla 5 muestran que no se observó efecto de mejora alguno sobre la hiperlipemia con la leche fermentada con CM4 que contenía Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro en comparación con el pienso testigo y el pienso de leche no fermentada. Por otro lado, los resultados de la Figura 1 muestran que la leche fermentada con CM4 inhibía

significativamente el engrosamiento de la túnica vascular íntima en comparación con el pienso testigo y el pienso de leche no fermentada. Teniendo en cuenta el hecho de que la leche no fermentada contiene una cantidad comparable o incluso mayor de componentes lácteos con respecto a la leche fermentada con CM4, el efecto de la presente invención no es meramente atribuible a componentes lácteos.

- 5 Se entiende por lo tanto que la leche fermentada con CM4 presenta el efecto de moderar el engrosamiento de la túnica vascular íntima a través de un mecanismo distinto de aquél para mejorar la hiperlipemia y, por consiguiente, es eficaz contra la aterosclerosis de los animales, incluyendo los seres humanos, causada por factores distintos de la hiperlipemia.

Ejemplo 2-2

- 10 Se mezclaron los péptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro sintetizados en el Ejemplo de Síntesis, la leche fermentada con CM4 preparada en el Ejemplo 2-1, y el polvo de producto de hidrólisis de caseína preparado en el Ejemplo 1 de Producción (al que más adelante se hace referencia como polvo del Ejemplo 1 de Producción), respectivamente, con un pienso en polvo comercialmente asequible (nombre comercial "CE-2", fabricado por CLEA JAPAN, INC.) en una relación como la mostrada en la Tabla 6, para preparar piensos sólidos. El pienso en polvo comercialmente asequible fue también utilizado como un testigo.

Prueba confirmatoria para el efecto de inhibición del engrosamiento de la túnica vascular íntima

- 20 Se dejó que ratones con ApoE inactivada (machos de 6 semanas de edad, 8 animales por cada grupo) accedieran libremente durante 31 semanas a los Pienso 1 a 7 que se muestran en la Tabla 6. La aorta torácica de los ratones fue luego extraída, fijada en formalina tamponada neutra al 10% y sometida al tinte Elastica-van Gieson. Se escanearon micrografías de las muestras tisulares en un ordenador y se calculó el grado de engrosamiento de la túnica vascular íntima [relación de las áreas íntima/media (%)] usando un software para procesamiento de imágenes (Image J). Los resultados se muestran en la Tabla 6. Los valores del grado de engrosamiento mostrados en la tabla son las medias de cada grupo.

Tabla 6

	Muestras añadidas a pienso	Cantidad de muestra añadida a pienso (% en peso)	Contenido de Val-Pro-Pro (mg/kg de pienso)	Contenido de Ile-Pro-Pro (mg/kg de pienso)	Grado de engrosamiento de la túnica íntima (%)	SE
Pienso 1	Val-Pro-Pro	0,0034	34,1	0,0	21,8	4,7
Pienso 2	Val-Pro-Pro	0,0340	341,0	0,0	18,7	3,2
Pienso 3	Ile-Pro-Pro	0,0017	0,0	17,1	25,3	5,4
Pienso 4	Ile-Pro-Pro	0,0170	0,0	171,0	20,5	4,6
Pienso 5	Leche fermentada con CM4	10,0000	34,1	17,1	18,5	5,0
Pienso 6	Polvo del Ejemplo 1 de Producción	0,8700	20,9	24,9	18,7	4,0
Pienso 7	Ninguna (testigo)	0,0	0,0	0,0	38,0	6,2

- 25 A partir de los resultados mostrados en la Tabla 6, se entiende que Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro inhibían el engrosamiento de la túnica vascular íntima de un modo dependiente de la concentración. Además, la leche fermentada con CM4 que contenía Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro, y el polvo de producto de hidrólisis de caseína de leche animal producido en el Ejemplo 1 de Producción que contenía Xaa-Pro-Pro y Xaa-Pro, también inhibían el engrosamiento de la túnica vascular íntima. De esta manera, se entiende que los agentes o el alimento que contienen al menos uno de los péptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro moderan el engrosamiento de la túnica vascular íntima y son eficaces para prevenir la aterosclerosis.

Ejemplos 3-1 y 3-2 y Ejemplos Comparativos 3 y 4

- 35 Se prepararon leches fermentadas del mismo modo que en el Ejemplo 2-1 usando la cepa CM4 (Ejemplo 3-1), *Lactobacillus helveticus* JCM1004 (Ejemplo 3-2), *Lactobacillus gasseri* JCM1131 (Ejemplo Comparativo 3) y el iniciador CH-1 liofilizado comercialmente asequible (fabricado por Chr. Hansen A/S, que contiene *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii sp. bulgaricus*), respectivamente, bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 7 en cuanto a la cantidad del líquido iniciador añadido y al tiempo de fermentación, y se obtuvo un producto liofilizado de cada leche fermentada.

El producto liofilizado así preparado fue mezclado con un pienso en polvo comercialmente asequible (nombre comercial "CE-2", fabricado por CLEA JAPAN, INC.) en una relación de 10:90 en peso para preparar un pienso sólido. En la Tabla 7 se muestran los contenidos de Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro de este pienso sólido.

- 5 Se llevó a cabo la prueba confirmatoria para el efecto de inhibición del engrosamiento de la túnica vascular íntima sobre cada uno de los piensos sólidos así producidos, del mismo modo que en el Ejemplo 2-2, y se calculó el grado de engrosamiento de la túnica íntima [relación de las áreas íntima/media (%)]. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Los valores del grado de engrosamiento de la túnica íntima de la tabla son las medias de cada grupo.

Tabla 7

	Cantidad de líquido iniciador añadido (%)	Tiempo de fermentación (h)	Contenido de Val-Pro-Pro (mg/kg de pienso)	Contenido de Ile-Pro-Pro (mg/kg de pienso)	Grado de engrosamiento de la túnica íntima (%)	SE
Testigo	–	–	0,0	0,0	28,0	4,5
Ejemplo 3-1	3,0	24	33,1	14,1	13,5*	1,5
Ejemplo 3-2	3,0	24	16,2	3,5	11,7*	3,1
Ej. Comp. 3	10,0	48	0,0	1,9	25,5	4,4
Ej. Comp. 4	3,0	24	6,0	2,4	19,4	4,2

*: $p < 0,05$

- 10 A partir de los resultados mostrados en la Tabla 7, se reveló que los productos de fermentación por *Lactobacillus helveticus* moderaban el engrosamiento de la túnica vascular íntima, efecto que no se observó con los productos de fermentación por otras especies bacterianas.

REIVINDICACIONES

1. Un agente que comprende Ile-Pro-Pro y/o Val-Pro-Pro para uso en la profilaxis de la aterosclerosis.
2. El agente según la reivindicación 1, que comprende además Xaa-Pro-Pro distinto de Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro.
- 5 3. El agente según la reivindicación 1, en donde dicho agente es un producto de hidrólisis de caseína de leche animal y en donde el contenido de dichos Ile-Pro-Pro y/o Val-Pro-Pro es no inferior al 0,3% en peso de la cantidad total de péptidos y aminoácidos libres en el producto de hidrólisis de caseína de leche animal.
4. El agente según la reivindicación 2, en donde dicho agente es un producto de hidrólisis de caseína de leche animal y en donde el contenido de dichos Ile-Pro-Pro, Val-Pro-Pro y Xaa-Pro-Pro es no inferior al 1% en peso de la cantidad total de péptidos y aminoácidos libres en el producto de hidrólisis de caseína de leche animal.
- 10 5. El agente según la reivindicación 3 o 4, en donde dicho producto de hidrólisis de caseína de leche animal comprende Xaa-Pro seleccionado del grupo que consiste en Ile-Pro, Glu-Pro, Arg-Pro, Gln-Pro, Met-Pro, Tyr-Pro, y una mezcla de los mismos.
6. El agente según la reivindicación 5, en donde el contenido de dicho Xaa-Pro es no inferior al 5% en peso de la cantidad total de péptidos y aminoácidos libres en el producto de hidrólisis de caseína de leche animal.
- 15 7. El agente según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde dicho producto de hidrólisis de caseína de leche animal es un producto de fermentación de caseína de leche animal con mohos de koji.
8. El agente según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde dicho producto de hidrólisis de caseína de leche animal es un producto de hidrólisis enzimática de caseína de leche animal con una enzima extracelular procedente de *Aspergillus oryzae*.
- 20 9. El agente según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho agente es un producto de fermentación de un material de partida que comprende proteína láctea con una cepa bacteriana de la especie *Lactobacillus helveticus*.
10. El agente según la reivindicación 9, en donde dicho *Lactobacillus helveticus* comprende la cepa CM4 de *Lactobacillus helveticus* (depositada en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, bajo el número de acceso FERM BP-6060).
- 25 11. Uso de un agente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la fabricación de un alimento funcional para uso en la profilaxis de la aterosclerosis.

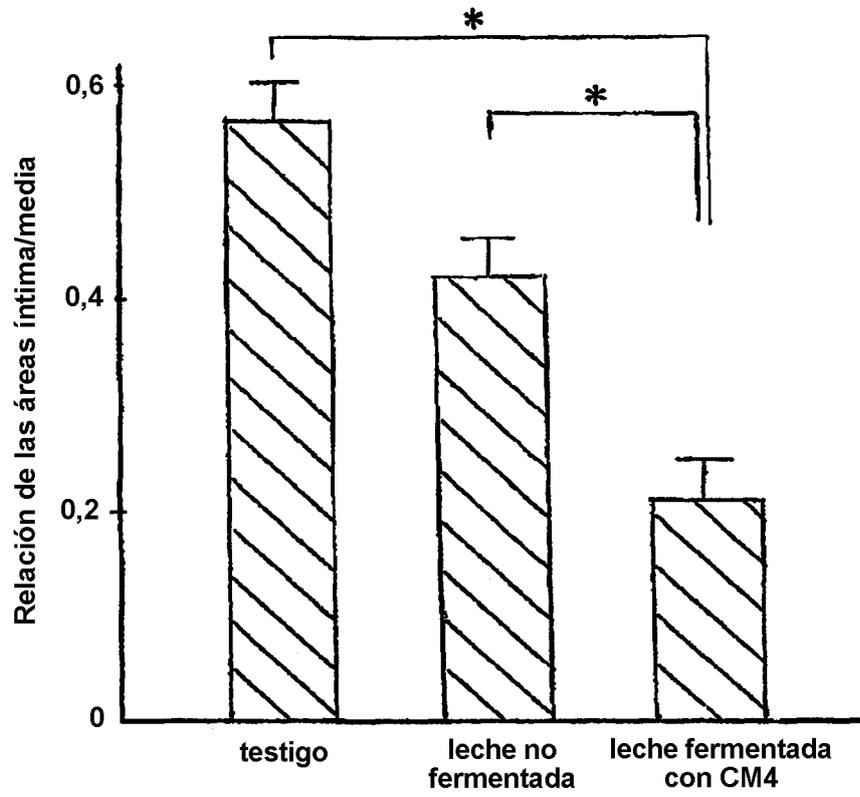


Fig. 1