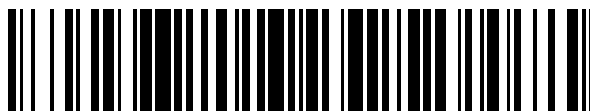


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 454**

51 Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)
A23J 3/34 (2006.01)
A61K 35/60 (2006.01)
A61K 38/01 (2006.01)
C07K 14/595 (2006.01)
A23J 3/04 (2006.01)
A23L 33/175 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2009 PCT/EP2009/051638**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2009 WO09101134**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2009 E 09710311 (3)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2247744**

54 Título: **Hidrolizado de proteínas de pescado con actividad saciante, composiciones nutracéuticas y farmacológicas que comprenden tal hidrolizado y procedimiento de obtención**

30 Prioridad:

12.02.2008 FR 0800751

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2016

73 Titular/es:

COMPAGNIE DES PECHES SAINT MALO SANTE (25.0%)
40 quai Duguay Trouin
35400 Saint-Malo, FR;
MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE (25.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (25.0%) y
UNIVERSITE DE LILLE 1 - SCIENCES ET TECHNOLOGIES (25.0%)

72 Inventor/es:

DRIEU LA ROCHELLE, HUBERT;
COUROIS, ELISA;
CUDENNEC, BENOÎT;
FOUCHEREAU-PERON, MARTINE y
RAVALLEC-PLE, ROZENN

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 590 454 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

Hidrolizado de proteínas de pescado con actividad saciante, composiciones nutraceuticas y farmacológicas que comprenden tal hidrolizado y procedimiento de obtención.

5 La presente invención se refiere a un hidrolizado de proteínas de pescado que contiene moléculas inmunológicamente emparentadas con la familia de las gastrinas/colecistoquininas y que puede ejercer una actividad saciante y regular la ingesta de alimentos en el hombre o los animales. La invención concierne además a un procedimiento de obtención de tal hidrolizado de proteínas de pescado, así como una composición, a un producto alimenticio, a un complemento alimenticio o incluso a un medicamento que comprende tal hidrolizado de proteínas de pescado.

10 Cada vez más en el seno de la población se observa sobrepeso, lo cual se ha convertido en una preocupación constante. Este fenómeno es el resultado de un desequilibrio entre el aporte energético medio y la suma del gasto energético. En efecto, cuando se aporta más de lo que gasta, una parte del aporte energético se almacena en forma de grasa en los adipocitos constitutivos del tejido adiposo. Estas células engrosan y conllevan entonces un sobrepeso visible. Éstas pueden llegar así a la saturación y multiplicarse. Se habla entonces de obesidad. En tal caso, el sobrepeso es directamente responsable de diversos problemas de salud, como problemas cardiovasculares, articulares o metabólicos.

15 Los factores responsables del sobrepeso son de dos tipos: por una parte, factores genéticos, el estilo de vida y el comportamiento alimenticio por otra parte. Es el segundo tipo de factor el que estudian actualmente las industrias agroalimentarias y nutraceuticas que se interesan por los factores biológicos que participan en los fenómenos fisiológicos responsables del comportamiento alimenticio, y más particularmente en el control de la saciedad. Un desajuste de este control puede ser causa no sólo de un sobrepeso, sino también de enfermedades graves ligadas a los problemas de la conducta alimentaria, como obesidad, diabetes tipo II, accidentes cardiovasculares, hipertensión, aterosclerosis e hipercolesterolemia.

20 Las colecistoquininas, denominadas CCK en lo que sigue, son una familia de péptidos neuroendocrinos. Éstas son secretadas al nivel de la luz del intestino delgado por células enteroendocrinas, así como al nivel de sistema nervioso central, lo que les confiere también un papel en la transferencia de la información entre el tracto gastrointestinal y el cerebro [1, 2]. El paso de los alimentos en la parte duodenal del intestino delgado conlleva la secreción de CCK. Esta secreción provoca numerosos procesos fisiológicos, como la motilidad intestinal, la contracción de la vesícula biliar, la inhibición del vaciado gástrico, la estimulación de la secreción pancreática y la inducción del fenómeno de saciedad [4]. La liberación de CCK es debida, por orden de importancia, a la acción de los compuestos proteicos, lipídicos y glucídicos [6].

25 Trabajos anteriores han demostrado el elevado potencial saciante ejercido por ciertos hidrolizados proteicos en la rata [7,8], el cerdo [5] y el hombre [9]. El documento Ravallec-Plé R. y col. (2003), Comparative Biochemistry and Physiology, Parte B, vol. 134, nº 4, páginas 669-679, se refiere a hidrolizados de proteínas de bacalao y de camarón obtenidos después de hidrólisis enzimática con ayuda de la enzima alcalasa (enzima derivada de *Bacillus licheniformis*). Estos hidrolizados contienen moléculas emparentadas con las gastrinas/CCK.

30 Los solicitantes han descubierto que hidrolizados de proteínas, o peptídicos, obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática del músculo de ciertos pescados poseen propiedades estimulantes de la secreción de CCK por las células enteroendocrinas intestinales.

El GLP-1, péptido 1 semejante a glucagón, es una hormona gastrointestinal secretada por las células epiteliales del intestino en respuesta a la ingesta de nutrientes.

35 El GLP-1 regula el metabolismo de los nutrientes y su eliminación aumentando la síntesis y la secreción de insulina cuando la glucemia es demasiado alta (glucemia post-prandial). En paralelo, el GLP-1 frena la liberación de glucagón, hormona hiperglucemiante, por la vía de los islotes pancreáticos.

El GLP-1 disminuye la movilidad digestiva e induce la sensación de saciedad.

40 Así, la invención concierne a un hidrolizado de proteínas de pescado que se caracteriza porque se obtiene por hidrólisis enzimática de al menos una fuente de proteínas seleccionada entre el grupo compuesto de las especies de pescados pelágicos *Micromesistius poutassou*, *Clupea harengus*, *Scomber scombrus*, *Sardina pilchardus*, *Trisopterus esmarki*, *Trachurus spp.*, de pescados demersales *Gadus morhua*, *Pollachius virens*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Coryphaenoides rupestris*, de pescados pertenecientes al orden de los

siluriformes, siendo realizada dicha hidrólisis enzimática por una mezcla de enzimas que comprenden endopeptidasas derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens* y de *Bacillus licheniformis*, y porque presenta:

- 5 – el reparto del perfil molecular siguiente: de un 23 a un 31% de moléculas de peso molecular inferior a 300 Da, de un 31 a un 34% de moléculas cuyo peso molecular está comprendido entre 300 y 1.000 Da, de un 28 a un 34% de moléculas cuyo peso molecular está comprendido entre 1.000 y 3.000 Da, de un 6 a un 8% de moléculas cuyo peso molecular está comprendido entre 3.000 y 5.000 Da y de un 2 a un 4% de moléculas cuyo peso molecular está comprendido entre 5.000 y 10.000 Da,
- 10 – un contenido en lípidos inferior al 1%, en porcentaje de producto bruto,
- un contenido en glúcidos inferior al 0,1%, en porcentaje de producto bruto,
- un contenido en proteínas superior al 80%, en porcentaje de producto bruto,
- un contenido en materia mineral comprendido entre un 10 y un 20%, en porcentaje de producto bruto,

y porque contiene moléculas inmunológicamente emparentadas con las colecistoquininas, o CCK.

15 El hidrolizado de proteínas según la invención permite un aporte de moléculas de CCK exógenas. Además, permite estimular la secreción de moléculas de CCK y de moléculas GLP1 endógenas por las células intestinales. El hidrolizado facilita así el control de la saciedad, como se demuestran en los ejemplos que siguen.

20 Según una característica de la invención, dicho hidrolizado de proteínas de pescado presenta la composición de aminoácidos siguiente: ácido glutámico 17,4%, ácido aspártico 11,4%, lisina 10,2%, leucina 8,4%, arginina 6,1%, alanina 6,8%, valina 4,7%, isoleucina 4,2%, glicina 5%, treonina 4,5%, serina 4,4%, tirosina 3,2%, fenilalanina 3,9%, metionina 2,5%, prolina 3,6%, histidina 1,9%, cistina 1%, triptófano 0,8%, en porcentaje en peso con relación al peso total de aminoácidos.

Según una forma de realización preferente de la invención, dicha fuente de proteínas de pescado está en forma de una pasta de filete de dicho o dichos pescados.

25 Según otra forma de realización de la invención, dicha mezcla de enzimas comprende, además, una endopeptidasa derivada de *Aspergillus oryzae*.

30 La presente invención se refiere también a un procedimiento de obtención de un hidrolizado de proteínas a partir de una fuente de proteínas de pescado que posee propiedades estimulantes de la secreción de las CCK y de los GLP1 al nivel de las células intestinales y que puede ejercer un efecto saciante, tal como se ha definido anteriormente. El procedimiento según la invención se caracteriza porque comprende:

- 35 – triturar al menos una fuente de proteínas seleccionada entre el grupo compuesto de las especies de pescados *Micromesistius poutassou*, *Clupea harengus*, *Scomber scombrus*, *Sardina pilchardus*, *Trisopterus esmarki*, *Trachurus spp.*, de pescados demersales *Gadus morhua*, *Pollachius virens*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Coryphaenoides rupestris*, de pescados pertenecientes al orden de los siluriformes, en presencia de agua, a fin de recuperar la pasta de pescado,
- realizar la hidrólisis enzimática de dicha fuente de proteínas a una temperatura comprendida entre 40 y 65°C, a un pH entre 6 y 9, durante 1 a 5 horas, después de añadir una mezcla de enzimas que comprende endopeptidasas derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens* y de *Bacillus licheniformis*, a fin de obtener una mezcla de reacción,
- 40 – detener dicha hidrólisis enzimática por desactivación de estas enzimas después de aumentarla temperatura de la mezcla de reacción a un nivel no inferior a 70°C durante 8 a 20 minutos,
- separar el hidrolizado de proteínas obtenido del resto de la mezcla de reacción.

45 La hidrólisis enzimática se realiza con ayuda de una mezcla de enzimas seleccionadas cuidadosamente para permitir la obtención de un hidrolizado de proteínas que tenga las propiedades buscadas y citadas anteriormente. El procedimiento, en cuanto a la naturaleza de las enzimas, la temperatura de hidrólisis y la ausencia de disolventes, respeta las cualidades organolépticas y nutricionales de los hidrolizados obtenidos. Estos hidrolizados pueden incorporarse en productos alimenticios, composiciones nutracéuticas o preparaciones farmacológicas.

50 Según una forma de realización de la invención, la trituración de la fuente de proteínas se realiza en presencia de agua según una proporción en masa fuente de proteínas/agua de 1.

Según una forma de realización de la invención, dicha hidrólisis enzimática se realiza según una proporción enzima/fuente de proteínas comprendida entre 0,01 y 2%. Preferentemente, la proporción enzima/fuente de proteínas es igual a 0,5%.

Según una forma de realización de la invención, dicha hidrólisis enzimática se realiza a una temperatura de 60°C.

Según una forma de realización de la invención, dicha hidrólisis enzimática se realiza a un pH de 7,5.

5 En general, la separación del hidrolizado de proteínas obtenido del resto de la mezcla de reacción se lleva a cabo por centrifugación a una velocidad entre 4.000 y 7.000 rpm y eliminando el sedimento obtenido. Preferentemente, la separación del hidrolizado de proteínas obtenido puede realizarse por filtración de la mezcla de reacción antes de dicha centrifugación. La filtración del medio de reacción permite eliminar las materias sólidas.

10 Según una forma de realización de la invención, el procedimiento comprende, por otra parte, la concentración y atomización o liofilización del hidrolizado obtenido.

Según una forma de realización de la invención, la detención de la hidrólisis enzimática se realiza cuando el grado de hidrólisis alcanza un valor máximo del 9% y preferiblemente entre el 8,75 y el 8,95%.

Según una forma de realización de la invención, el pH de la mezcla de reacción durante la hidrólisis se controla y se mantiene constante por adición de hidróxido de sodio a una concentración $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

15 Según otra forma de realización de la invención, la mezcla de enzimas comprende además una endopeptidasa derivada de *Aspergillus oryzae*.

20 El hidrolizado de proteínas obtenido después de la reacción de hidrólisis en presencia de una mezcla de tres enzimas derivadas respectivamente de *Bacillus amyloliquefaciens*, de *Bacillus licheniformis* y de *Aspergillus oryzae* presenta las mismas propiedades y características físico-químicas que un hidrolizado de proteínas obtenido después de una reacción de hidrólisis en presencia de una mezcla de dos enzimas derivadas respectivamente de *Bacillus amyloliquefaciens* y de *Bacillus licheniformis*.

25 Según una forma de realización ventajosa del procedimiento según la invención, la mezcla de enzimas se selecciona de entre la mezcla CR1020 o la mezcla Protamex. La mezcla CR 1020 es comercializada por la sociedad Meatzyme (Chr Winthersvej 36A, 2800 Kgs Lyngby, Dinamarca). La mezcla Protamex es comercializada por la sociedad Novozyme (Krogshoejvej 36, Dinamarca-2880 Bagsvaerd).

Según una forma de realización de la invención, la detención de dicha hidrólisis enzimática se realiza elevando la temperatura de la mezcla de reacción hasta 90°C y manteniendo esta temperatura durante 10 minutos.

30 Según una forma de realización preferente de la invención, la trituración de dicha fuente de proteínas se realiza a partir del filete de dicho o dichos pescados.

El procedimiento según la invención permite así obtener un hidrolizado de proteínas de pescado tal como se ha descrito anteriormente.

La presente invención se refiere también a una composición, un producto alimenticio y un complemento alimenticio que comprende un hidrolizado de proteínas de pescado tal como se ha descrito anteriormente.

35 La presente invención se refiere también a un medicamento que comprende un hidrolizado de proteínas de pescado tal como se ha descrito anteriormente, así como a la utilización de tal hidrolizado de proteínas de pescado para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la obesidad y de la diabetes tipo II. De hecho, como se ha explicado anteriormente, el hidrolizado de proteínas de pescado según la invención puede utilizarse en el tratamiento o la prevención de tales patologías.

40 La presente invención se refiere también al uso no farmacéutico de un hidrolizado de proteínas de pescado tal como se define anteriormente en el aumento del fenómeno de la saciedad.

45 Las formulaciones nutracéuticas o farmacéuticas que incorporan un hidrolizado de proteínas de pescado según la invención podrán comprender los ingredientes utilizados habitualmente en este tipo de formulaciones, tales como ligantes, agentes saborizantes, conservantes, colorantes, y podrán presentarse, en el caso de complementos alimenticios o de medicamentos, en forma de comprimidos, granulados o cápsulas. Las formulaciones según la invención podrán presentarse igualmente en forma de productos alimenticios como bebidas, o incluso en forma de suspensiones o jarabes.

Las características de la invención arriba mencionadas, así como otras, se evidencian más claramente de la lectura de la descripción siguiente de un ejemplo de realización, pretendiendo dicho ejemplo ser ilustrativo y no limitativo.

- 5 Fig. 1: ilustra la evolución del grado de hidrólisis del hidrolizado de proteínas de bacaladilla según la invención,
 Fig. 2: ilustra el reparto de peso molecular de los fragmentos proteicos de un hidrolizado de proteínas de bacaladilla según la invención, y
 Fig. 3 a 5: ilustran los repartos de peso molecular de los fragmentos proteicos de hidrolizados de proteína de otras especies de pescado según la invención,
 10 Fig. 6: ilustra la secreción de moléculas de CCK por las células STC-1 en presencia o ausencia de un hidrolizado de proteína de bacaladilla según la invención,
 Fig. 7: ilustra la secreción de moléculas de GLP1 por las células STC-1 en presencia o ausencia de un hidrolizado de proteína de bacaladilla según la invención,
 Fig. 8: ilustra el efecto de un hidrolizado de proteína de bacaladilla según la invención sobre la ingesta alimenticia en la rata, y
 15 Fig. 9 y 10: muestran las dosis plasmáticas de moléculas de CCK y de GLP1, respectivamente, en la rata después de la ingesta o no de un hidrolizado de proteína de bacaladilla según la invención.

Ejemplo 1: Hidrolizado de proteínas obtenido a partir de bacaladilla, *Micromesistius poutassou* (H1)

20 La bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) se pesca en el Atlántico Norte a lo largo de Terranova. Los pescados se cortan en filetes, que se trituran a continuación a fin de obtener su pasta. Esta pasta de pescado constituye una fuente de proteínas para la producción del hidrolizado. La pasta se conserva a -20°C hasta su utilización.

Tres kg de pasta de bacaladilla previamente descongelados se mezclan con agua en una proporción en masa de 1. La temperatura de la mezcla se lleva a 60°C y el pH se ajusta a 7,5 con una disolución de hidróxido de sodio 1M, agitando.
 25

Una mezcla compuesta de tres enzimas, derivadas respectivamente de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* y *Aspergillus oryzae*, y comercializada bajo el nombre CR 1020 por la sociedad Meatzyme (Chr Winthersvej 36A, 2800 Kgs Lyngby, Dinamarca) se añaden luego a la mezcla de reacción en una proporción enzima/fuente de proteínas de 0,5%. Durante la reacción de hidrólisis, el pH se mantiene constante a 7,5 por adición de hidróxido de sodio (NaOH) 1M.
 30

La reacción de hidrólisis de las proteínas de bacaladilla se conduce durante 2 horas en condiciones controladas conforme al método bien conocido denominado pH-STAT. El método pH-STAT está basado en mantener constante del pH durante la reacción de hidrólisis. El alcance de la hidrólisis se cuantifica así por el grado de hidrólisis (DH), que viene determinado por el número de enlaces peptídicos disociados dividido entre el número total de enlaces peptídicos.
 35

El DH se calcula a partir del volumen y de la molaridad de la base utilizada para mantener constante el pH. Mientras el pH se mantiene constante, existe una relación entre el número de enlaces hidrolizados y el volumen de hidróxido de sodio vertido. Para un sistema enzimático dado y a pH constante, la funcionalidad será la misma de un hidrolizado a otro, si la reacción se detiene cada vez al mismo DH.

40
$$\% \text{ DH} = \frac{(\text{B} \cdot \text{NB})}{(\alpha \cdot \text{htot} \cdot \text{MP})} * 100$$

donde:

- B es el consumo de base (en mL o L)
- NB es la normalidad de la base
- α es la media de disociación de los grupos HN o COOH
- 45 • MP es la masa de proteínas (determinada por el método de Kjeldahl, en g o kg)
- htot es el número total de enlaces peptídicos

Después de 2 horas de reacción de hidrólisis, el DH final del hidrolizado de proteínas es del 8,9% (Fig. 1).

La desactivación de las enzimas al final de la cinética de hidrólisis se realiza elevando la temperatura del medio de reacción hasta 90°C. Esta temperatura se mantiene durante 10 minutos.

ES 2 590 454 T3

El hidrolizado de proteínas de bacaladilla obtenido, denominado en lo sucesivo H1, se filtra a continuación sobre un tamiz (rejilla de 2 mm/2 mm) a fin de eliminar las materias sólidas. La fracción recuperada en el recipiente se centrifuga luego durante 30 minutos \pm 5 minutos, a una velocidad entre 4.000 y 7.000 rpm. Después de eliminar el sedimento, se recupera el sobrenadante, se liofiliza y se conserva en un lugar fresco y seco, protegido de la luz. Igualmente, el sobrenadante puede atomizarse.

En una variante de la invención, es posible desactivar las enzimas endógenas elevando la temperatura hasta la ebullición antes de añadir la mezcla de las enzimas citadas anteriormente.

En otra variante de la invención, la hidrólisis enzimática se realiza a partir de una mezcla compuesta de dos enzimas derivadas respectivamente de *Bacillus amyloliquefaciens* y de *Bacillus licheniformis* y comercializada bajo el nombre Protamex por la sociedad Novozyme (Krogshoejvej 36, Dinamarca-2880 Bagsvaerd).

Análisis físico-químico del hidrolizado de proteínas obtenido a partir de bacaladilla

Se realizó la determinación de los pesos moleculares de los péptidos constitutivos del hidrolizado de proteínas obtenido por cromatografía de exclusión estérica (SEC-HPLC).

El hidrolizado de proteínas H1, en forma de polvo después de liofilización, se suspende en agua ultrapura (20 mg/ml), se filtra a continuación sobre una membrana de 0,45 μ m y se analiza por filtración sobre gel con una columna Superdex Peptide HR 10/30, comercializada por la sociedad Pharmacia. La matriz de la columna está compuesta por un gel poroso reticulado (diámetro 13-15 μ m) de agarosa y dextrano con un volumen total de 24 ml. Su campo de fraccionamiento está comprendido entre 100 y 7.000 Da. La columna está montada en una cadena HPLC (comercializada por la sociedad Dionex) equipada con una bomba (módulo Dionex P680). La medida se realiza con un detector de Ultra-Violeta multi-longitud de onda (módulo Dionex UVD 170 U). El hidrolizado de proteínas se eluye con una fase móvil que contiene acetonitrilo, agua y TFA. La elución dura aproximadamente 1 hora a un caudal de 0,5 ml/minuto.

El reparto de los pesos moleculares se calcula a partir de los parámetros de una recta de calibración obtenida después del paso por la columna de marcadores de peso molecular conocidos. Estos marcadores son citocromo C (12.400 Da), aprotinina (6.511 Da), gastrina I (2.126 Da), sustancia P (1.348 Da), fragmento 1-7 de sustancia P (900 Da), glicina (75 Da) y leupeptina (463 Da). Los datos se recogen con el software Chromeleon (Dionex). Los porcentajes de peso molecular se calculan con ayuda de un software (GPC Cirrus de la sociedad Polymer Laboratories). La longitud de onda de adquisición es 214 nm. El reparto de los pesos moleculares en función dW/logM se muestra en la Fig. 2 y el reparto de los pesos moleculares por clase de tamaño se muestra en la Tabla 2, más adelante. El porcentaje del área bajo la curva corresponde al porcentaje de moléculas peptídicas.

La composición de aminoácidos del hidrolizado de proteínas de bacaladilla H1 se muestra en la Tabla 1 (según la directiva europea 98/64/CE y NF EN ISO 13904-octubre 2005). La Tabla 2 muestra el reparto de los aminoácidos en el hidrolizado de proteínas H1.

35

Tabla 1

Aminoácido	Porcentaje de aminoácido	Aminoácido	Porcentaje de aminoácido
Ác. glutámico	17,4	Glicina	5
Lisina	10,2	Treonina	4,5
Ác. aspártico	11,4	Serina	4,4
Leucina	8,4	Tirosina	3,2
Arginina	6,1	Fenilalanina	3,9
Alanina	6,8	Metionina	2,5
Valina	4,7	Prolina	3,6
Isoleucina	4,2	Histidina	1,9
Cistina	1	Triptófano	0,8

El contenido de proteínas es superior al 80%, en porcentaje de producto bruto (según NF V18-120-marzo 1997- KJELDAHL corregido).

40 El contenido de lípidos es inferior al 1%, en porcentaje de producto bruto (según la directiva europea 98/64/CE).

El valor energético del hidrolizado de proteínas H1 es aproximadamente 330 Kcal/100 g.

El contenido de glúcidos es inferior al 0,1% (deducido a partir de los contenidos de proteínas y glúcidos y del valor energético).

Ejemplo 2: Hidrolizado de proteínas obtenido a partir de otras especies de pescado según la invención

5 Hidrolizados de proteínas de caballa (H2) (*Scomber scombrus*), jurel (H3) (*Trachurus spp.*), granadero (H4) (*Coryphaenoides rupestris*) (Fig. 3); faneca (H5) (*Trisopterus esmarki*), sardina (H6) (*Sardina pilchardus*), arenque (H7) (*Clupea harengus*), panga (H8) (Suliforme) (Fig. 4); bacalao (H9) (*Gadus morhua*), fogaño (H10) (*Pollachius virens*) y abadejo (H11) (*Melanogrammus aeglefinus*) (Fig. 5) se preparan según el procedimiento del ejemplo 1. El reparto de los pesos moleculares de los péptidos que componen cada hidrolizado se analiza según el mismo procedimiento utilizado en el ejemplo 1.

El reparto de los pesos moleculares en función dW/logM se muestra en las Fig. 3 a 5, y el reparto de los pesos moleculares por clase de tamaño se muestra en la Tabla 2 siguiente. El porcentaje del área bajo la curva corresponde al porcentaje de moléculas peptídicas.

Tabla 2

Clases	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H10	H9	H11
<0,3	23-31	30	23	23	23	25	23	23	24	24	29
0,3-1	31-34	33	34	33	32	31	32	33	31	34	33
1-3	28-34	29	33	34	33	32	33	34	33	34	28
3-5	6-8	6	7	7	8	8	8	7	8	6	6
5→10	2-4	2	3	3	4	4	4	3	4	2	4

15

Los hidrolizados H1 a H11 muestran un perfil de reparto de peso molecular idéntico.

Ejemplo 3: Dosificación de moléculas inmunológicamente emparentadas con las colecistoquininas (CCK) en el hidrolizado de proteínas de bacaladilla H1

20 Las moléculas emparentadas con las CCK presentes en el hidrolizado de proteínas H1 se dosifican por dosificación radioinmunológica con ayuda del kit RIA (GASK-PR, CIS bio-international, Bagnols/Cèze, Francia) (test realizado por triplicado). Por moléculas emparentadas con CCK se entienden todas las moléculas capaces de fijarse a un anticuerpo específico dirigido contra los ocho aminoácidos comunes a las gastrinas y CCK, siendo dicho anticuerpo el anticuerpo utilizado en la dosificación citada anteriormente. La gastrina y las CCK poseen secuencias peptídicas idénticas en la parte C-terminal de sus secuencias peptídicas.

25

El hidrolizado de proteínas contiene 5,6 pg de moléculas emparentadas con las gastrinas/CCK por miligramo de peso seco de hidrolizado.

El hidrolizado según la invención permite así un aporte de moléculas emparentadas con las moléculas de CCK.

30 **Ejemplo 4: Test de cultivo celular *in vitro*: efecto sobre la estimulación de la secreción de moléculas de CCK y sobre la estimulación de la secreción de moléculas de GLP1**

El hidrolizado de proteínas H1 se ensayó respecto a su capacidad para estimular la secreción de moléculas de CCK, así como de GLP1, al nivel de las células enteroendocrinas de tipo STC1. De hecho, la secreción de CCK y de GLP1 por las células endocrinas intestinales representa una de las principales señales que constituyen el fenómeno de la saciedad. Las células STC-1 son células pluri-hormonales derivadas de células endocrinas tumorales procedentes del intestino delgado de ratón. Las células STC1 se utilizan como modelo celular para el estudio de los fenómenos que inducen la secreción específica de CCK [10] y como modelo celular para el estudio de los fenómenos inductores de la secreción específica de GLP1 [11].

35

Las células STC-1 se cultivan en medio DMEM que contiene 2 mM de L-glutamina, 2 mM de penicilina, 50 µM de estreptomycinay 10% de suero bovino fetal (SVF). Entre 2 y 3 días antes de la realización del test, las células STC-1 se cultivan en placas de 24 pocillos a un nivel de 30.000 a 40.000 células por pocillo. Cuando las células alcanzaron un nivel de confluencia de aproximadamente el 85%, los pocillos se lavaron dos veces con tampón de incubación (4,5 mM KCl, 1,2mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 10 mM Glucosa, 140 mM NaCl y 20 mM Hepes-Tris, pH 7,4).

40

Las células se incubaron a continuación durante 2 horas en presencia de diferentes soluciones compuestas bien de seroalbúmina bovina (BSA), de hidrolizado de proteínas H1 a diferentes concentraciones, de aminoácidos libres (véase la Tabla 3), de un hidrolizado comercial de ovoalbúmina (AEH) o del tampón de incubación utilizado como testigo de cultivo (control). Los sobrenadantes de los cultivos se centrifugaron (5 minutos, 2.000g). Después de la centrifugación, los sobrenadantes se recuperaron y conservaron a -20°C antes de dosificar el contenido de CCK de los mismos por dosificación radioinmunológica con ayuda del kit RIA (GASK-PR, CIS Bio International, Bagnols/Cèze, Francia) (las células STC-1 no secretan gastrinas en absoluto). La dosificación se realiza conforme al protocolo suministrado por el distribuidor. Las concentraciones de GLP-1 en su forma activa secretada por las células STC-1 se determinaron con ayuda del kit de dosificación radioinmunológica (GLP1A-35HK, Linco Research, St Charles, MO, USA). La dosificación se realiza conforme al protocolo suministrado por el distribuidor.

Los resultados concernientes a la dosificación de las moléculas de CCK se muestran en la Fig. 6 y se expresan en picomol/l (pM) de CCK excretados por las células. Los resultados concernientes a la dosificación de las moléculas de GLP1 se muestran en la Fig. 7 y se expresan en picomol/l de GLP1 excretados por las células.

En las Fig. 6 y 7, el signo * designa valores significativamente diferentes del valor obtenido para el control (test T ($P < 0,05$)). Las letras (a, b, c, d) representan valores significativamente diferentes unos de otros (test T, $P < 0,05$).

Tabla 3: Composición de la solución en aminoácidos libres

Aminoácido	Cantidad (mg/l)	Aminoácido	Cantidad (mg/l)
Ácido L-glutámico	151	Glicina	128
L-Lisina	88	L-Treonina	64
Ácido L-aspartico	151	L-Serina	26
L-Leucina	112	L-Tirosina	06
L-Arginina	277	L-Fenilalanina	91
L-Alanina	96	L-Metionina	40
L-Valina	80	L-Prolina	53
L-Isoleucina	64	L-Histidina	72
L-Cisteína	16	L-Triptófano	16

Los resultados muestran el efecto significativo del hidrolizado de proteínas de bacaladilla H1 a diferentes concentraciones (0,2; 0,5 y 1,0%, relación masa/volumen) sobre la secreción a la vez de moléculas CCK y moléculas GLP1 en el medio extracelular por las células STC-1 con relación a las otras soluciones testadas.

La cantidad de moléculas CCK y GLP1 liberadas por las células aumentan de manera significativa con las concentraciones del hidrolizado (Fig. 6 y 7). La cantidad de moléculas de CCK obtenida a partir del hidrolizado concentrado al 1,0% fue 30 veces superior a la obtenida con el testigo de cultivo (122,03 pM de CCK contra 4,02 pM de CCK, respectivamente). Las cantidades de CCK obtenidas en presencia de BSA o de aminoácidos libres al 1,0% son considerablemente inferiores a las obtenidas en presencia de los hidrolizados a la misma concentración (31,2 y 8,6 pM, respectivamente). Las mismas observaciones se constatan en lo que concierne a la secreción de las moléculas de GLP1.

Estos resultados indican que el hidrolizado de proteínas de bacaladilla contiene moléculas capaces de estimular fuertemente la secreción de las moléculas de CCK y de GLP1 por las células STC-1. Los débiles potenciales estimulantes de las soluciones de BSA y de aminoácidos libres indican que el efecto estimulador de la secreción de las moléculas de CCK y GLP1 no es debido ni por una parte a un "efecto proteína", ni por otra parte a la acción de los aminoácidos libres presentes en gran número en el hidrolizado de bacaladilla. Por tanto, esta estimulación parece debida mayoritariamente a las moléculas peptídicas contenidas en el hidrolizado de proteínas H1.

Ejemplo 5: Demostración del efecto saciante de un hidrolizado de proteína según la invención en la rata - estudio *in vivo* -

Se evaluaron las propiedades del hidrolizado H1 obtenido según el ejemplo 1 respecto a la ingesta alimenticia en la rata, así como respecto a diferentes parámetros sanguíneos. La finalidad era poner de manifiesto un

efecto saciante del hidrolizado sobre la ingesta alimenticia, corroborado por parámetros fisiológicos endocrinos.

Protocolo experimental:

5 32 ratas Wistar macho de 275 a 290 g (Harlan, Francia) divididas en 4 grupos de 8 individuos se mantuvieron en jaulas individuales opacas cerradas por una rejilla de aluminio (para privarlas de la vista de las otras ratas y no perturbar su alimentación). Las ratas se acomodaron en una sala climatizada a una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ y un ciclo día:noche de 12 horas (17h/5h). Los animales tenían acceso *ad libitum* a la comida (Alimento Completo, Harlan, Francia) y al agua durante el periodo de adaptación (5 días) y las dos primeras semanas de experimentación.

10 Cada grupo de ratas se ceba con composiciones de cebado diferentes:

- grupo 1: agua
- grupo 2: H1 ($50 \text{ mg}\cdot\text{día}^{-1}$)
- grupo 3: H1 ($100 \text{ mg}\cdot\text{día}^{-1}$)
- grupo 4: H1 ($250 \text{ mg}\cdot\text{día}^{-1}$)

15 Cada rata se cebó individualmente en una sala aparte, fuera de la vista de las otras ratas, con 0,5 ml de agua o de hidrolizado H1 disuelto ($50, 100$ o $250 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ según el grupo). La duración del cebado puede estimarse en 3 minutos por rata y permite efectuar la medida de la ingesta alimenticia (por pesada del alimento consumido), presentándose en paralelo el alimento completo a la rata 10 minutos después del cebado. Las camas se cambian igualmente en el momento del cebado una vez por semana, y la pesada de las ratas tiene
20 lugar una vez por semana el lunes.

1. Ingesta alimenticia

Después de pesarlas a fin de formar grupos de pesos medios equivalentes, las ratas se mantuvieron en periodo de adaptación durante los 7 días que precedían al comienzo de la experimentación. La fase de experimentación comenzó el lunes (J1) de la primera semana y continuó durante dos semanas.

25 El primer día de la experimentación (J1) por la mañana, las ratas se mantuvieron en ayunas durante 24 horas. El segundo día (J2) por la mañana, las ratas se pesaron y se sometieron a una extracción de sangre al nivel del extremo de la cola (con recogida en tubos que contienen EDTA al 5%), después de lo cual se puso de nuevo a su disposición el alimento completo. Las muestras de sangre se centrifugaron a continuación, y el plasma se conservó a -20°C .

30 Las ratas de los 4 grupos se cebaron una primera vez con su composición de cebado respectiva vía orogástrica con ayuda de una sonda intragástrica el segundo día (J2) a las 17 horas. Una primera medida de la ingesta alimenticia por pesada se realizó 2 horas más tarde. La mañana del tercer día (J3), se evaluó nuevamente la ingesta alimenticia antes del cebado dedicado a las 9 horas, realizándose luego de nuevo una medida de la ingesta alimenticia 3 horas más tarde. Las ratas se cebaron nuevamente a las 17 horas y se
35 midió al mismo tiempo la ingesta alimenticia, midiéndose nuevamente 2 horas después. Estas etapas de cebado y medidas se realizaron hasta el quinto día (J5) incluida la noche, y se repitieron una segunda semana desde el lunes (día J8) por la mañana hasta el viernes (día J12) por la noche.

2. Hormonas plasmáticas

40 Al final de la segunda semana, se sacrificaron las ratas por decapitación 30 minutos después del cebado y se extrajo la sangre en un tubo/EDTA al 5%. Se dividió el plasma en 3 partes alícuotas a fin de dosificar las hormonas circulantes siguientes:

- alícuota 1: GLP-1
- alícuota 2: CCK

Resultados

45 1. Ingesta alimenticia

Los resultados mostrados en la Fig. 8 expresan el consumo total de alimento de las ratas, en gramos de alimento y en función de su peso inicial, durante el conjunto de las 2 semanas de experimentación. Los valores son las medias de los valores diarios obtenidos para cada grupo a lo largo de la experimentación, y se expresan \pm SEM; *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$.

Así, los resultados muestran que entre las 9 horas y las 19 horas los valores relativos a la ingesta alimenticia obtenidos para los grupos 2, 3 y 4 que recibieron H1 son significativamente inferiores a los obtenidos para el grupo testigo 1 que no recibió H1. Se observa una disminución de la ingesta alimenticia en función de la dosis diaria de hidrolizado H1; si bien no existe diferencia significativa alguna entre los grupos 2, 3 y 4, la probabilidad de que exista una diferencia entre el grupo testigo 1 y los otros grupos 2, 3, y 4 aumenta con la dosis diaria de hidrolizado administrada.

2. Hormonas plasmáticas

Las concentraciones de CCK en el plasma de ratas se midieron con ayuda de una dosificación radioinmunológica disponible de Compagnie des Pêches Saint Malo-Santé. Esta dosificación tiene la particularidad de utilizar un anticuerpo específico, desarrollado en 1998 (Rehfeld 1998), de las CCK activas sulfatadas, que no se cruzan con las diferentes formas de gastrina (presentes en el plasma en mayor cantidad que las CCK). Este protocolo se ha puesto a punto sobre todo a partir de un kit de dosificación distribuido por la sociedad IBL (IBL, Hamburgo, Alemania) utilizando el mismo anticuerpo. Las concentraciones de GLP-1 en su forma plasmática activa se determinaron con el kit de dosificación radioinmunológica (GLP1A-35HK, Linco Research, St Charles, MO, USA). La dosificación se realiza siguiendo el protocolo suministrado por el distribuidor. Los resultados se muestran en las Fig. 9 y 10. Las concentraciones plasmáticas de GLP-1 (Fig. 10) y CCK (Fig. 9) se expresan en $\text{pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ de plasma sanguíneo. Los valores son las medias de cada grupo, expresadas \pm SEM. *: test T, $p < 0,05$, **: test T, $p < 0,01$. En la Fig. 9, las medias a las que no se asigna una letra idéntica son diferentes.

Se observa que las concentraciones plasmáticas de GLP1 son significativamente diferentes de la obtenida con el testigo, cualquiera que sea la dosis de hidrolizado recibida por el animal. Las concentraciones plasmáticas de CCK para los grupos que recibieron 100 o 250 $\text{mg}\cdot\text{día}^{-1}$ de H1 son significativamente diferentes de la obtenida con el testigo. Este análisis reúne el análisis de la ingesta alimenticia.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Strader AD, Woods SC. Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* 2005; 128:175-191.
- [2] Moran TH, Kinzig KP. Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2004; 286 : G183-188.
- [3] Moran TH. Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition* 2000; 16:858-865
- [4] Chaudhri O, Small C, Bloom S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philos Trans R Soc Lond B BiolSci* 2006; 361:1187-209.
- [5] Cuber JC, Bernard C, Levenez F, Chayvialle JA. [Lipids, proteins and carbohydrates stimulate the secretion of intestinal cholecystokinin in the pig]. *Reprod Nutr Dev* 1990; 30:267-75.
- [6] Baile CA, McLaughlin CL, Della-Fera MA. Role of cholecystokinin and opioid peptides in control of food intake. *Physiol Rev* 1986; 66 : 172-234.
- [7] Liddle RA, Green GM, Conrad CK, Williams JA. Proteins but not amino acids, carbohydrates, or fats stimulate cholecystokinin secretion in the rat. *Am J Physiol* 1986; 251:G243-8.
- [8] Douglas BR, Woutersen RA, Jansen JB et al. The influence of different nutrients on plasma cholecystokinin levels in the rat. *Experientia* 1988; 44:21-3.
- [9] Miazza B, Palma R, Lachance JR et al. Jejunal secretory effect of intraduodenal food in humans. A comparison of mixed nutrients, proteins, lipids, and carbohydrates. *Gastroenterology* 1985; 88:1215-22.
- [10] Mangel AW et al. Phenylalanina-stimulated secretion of cholecystokinin is calcium dependent. *Am J Physiol*, 1995. 268(1 Pt 1): p. G90-4.
- [11] Brubaker PL, Izzo A, Rocca AS. Synthesis and secretion of intestinal proglucagon-derived peptides by the STC-1 enteroendocrine cell line. *Can J Diabetes*. 2003;27:141-148.

Reivindicaciones

1. Hidrolizado de proteínas de pescado caracterizado porque se obtiene por hidrólisis enzimática de al menos una fuente de proteínas seleccionada entre el grupo compuesto de las especies de pescados *Micromesistius poutassou*, *Clupea harengus*, *Scomber scombrus*, *Sardina pilchardus*, *Gadus morhua*, *Pollachius virens*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Coryphaenoides rupestris*, *Trisopterus esmarki*, *Trachurus spp.*, pescados pertenecientes al orden de los siluriformes, siendo realizada dicha hidrólisis por una mezcla de enzimas que comprenden endopeptidasas derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens* y de *Bacillus licheniformis*, y porque presenta:
- el reparto del perfil molecular siguiente: de un 23 a un 31% de moléculas de peso molecular inferior a 300 Da, de un 31 a un 34% de moléculas cuyo peso molecular está comprendido entre 300 y 1.000 Da, de un 28 a un 34% de moléculas cuyo peso molecular está comprendido entre 1.000 y 3.000 Da, de un 6 a un 8% de moléculas cuyo peso molecular está comprendido entre 3.000 y 5.000 Da y de un 2 a un 4% de moléculas cuyo peso molecular está comprendido entre 5.000 y 10.000 Da,
 - un contenido en lípidos inferior al 1%, en porcentaje de producto bruto,
 - un contenido en glúcidos inferior al 0,1%, en porcentaje de producto bruto,
 - un contenido en proteínas superior al 80%, en porcentaje de producto bruto,
 - un contenido en materia mineral comprendido entre un 10 y un 20%, en porcentaje de producto bruto,
- y porque contiene moléculas inmunológicamente emparentadas con las colecistoquininas, o CCK.
2. Hidrolizado de proteínas de pescado según la reivindicación 1, caracterizado porque presenta la composición de aminoácidos siguiente: ácido glutámico 17,4%, ácido aspártico 11,4%, lisina 10,2%, leucina 8,4%, arginina 6,1%, alanina 6,8%, valina 4,7%, isoleucina 4,2%, glicina 5%, treonina 4,5%, serina 4,4%, tirosina 3,2%, fenilalanina 3,9%, metionina 2,5%, prolina 3,6%, histidina 1,9 %, cistina 1%, triptófano 0,8%, en porcentaje en peso con relación al peso total de aminoácidos.
3. Hidrolizado de proteínas de pescado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque la fuente de proteínas de pescado comprende la pasta obtenida a partir del filete de dicho o dichos pescados.
4. Hidrolizado de proteínas de pescado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicha mezcla de enzimas comprende además una endopeptidasa derivada de *Aspergillus oryzae*.
5. Procedimiento de obtención de un hidrolizado de proteínas de pescado tal como se define en las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque comprende:
- triturar al menos una fuente de proteínas seleccionada entre el grupo compuesto de las especies de pescados *Micromesistius poutassou*, *Clupea harengus*, *Scomber scombrus*, *Sardina pilchardus*, *Trisopterus esmarki*, *Trachurus spp.*, de pescados demersales *Gadus morhua*, *Pollachius virens*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Coryphaenoides rupestris*, de pescados pertenecientes al orden de los siluriformes, en presencia de agua, a fin de recuperar la pasta de pescado,
 - realizar la hidrólisis enzimática de dicha fuente de proteínas a una temperatura comprendida entre 40 y 65°C, a un pH entre 6 y 9, durante 1 a 5 horas, después de añadir una mezcla de enzimas que comprende endopeptidasas derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens* y de *Bacillus licheniformis*, según una proporción enzima/fuente de proteínas entre 0,01 y 2%, a fin de obtener una mezcla de reacción,
 - detener dicha hidrólisis enzimática por desactivación de estas enzimas después de aumentarla temperatura de la mezcla de reacción a un nivel no inferior a 70°C durante 8 a 20 minutos,
 - separar el hidrolizado de proteínas obtenido del resto de la mezcla de reacción.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque la proporción enzima/fuente de proteínas es igual a 0,5%, la temperatura de hidrólisis es de 60°C y el pH es 7,5.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, caracterizado porque la detención de dicha hidrólisis enzimática se realiza cuando el grado de hidrólisis alcanza 8,9.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado porque la mezcla de enzimas contiene además una endopeptidasa derivada de *Aspergillus oryzae*.
9. Composición caracterizada porque comprende un hidrolizado de proteínas de pescado tal como se define en las reivindicaciones 1 a 4.

- 10. Composición según la reivindicación 9, caracterizada porque se presenta en forma de un producto alimenticio, de un complemento alimenticio o de una composición nutracéutica.
- 11. Composición farmacéutica caracterizada porque comprende un hidrolizado de proteínas de pescado tal como se define en las reivindicaciones 1 a 4.
- 5 12. Utilización de un hidrolizado de proteínas de pescado tal como se define en las reivindicaciones 1 a 4 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la obesidad o de la diabetes tipo II.
- 13. Hidrolizado de proteínas de pescado tal como se define en las reivindicaciones 1 a 4 para su utilización en el tratamiento de la obesidad o de la diabetes tipo II.
- 10 14. Utilización no farmacéutica de un hidrolizado de proteínas de pescado tal como se define en las reivindicaciones 1 a 4 en el aumento del fenómeno de la saciedad.

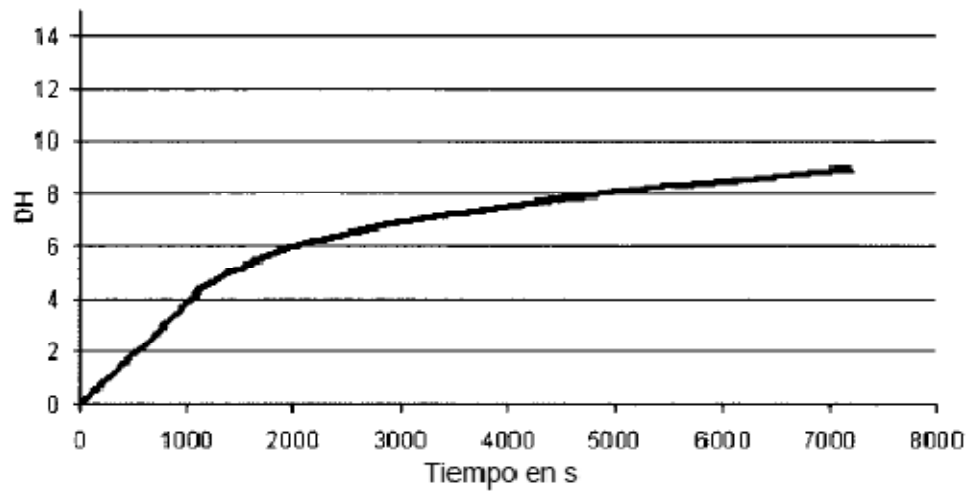


Fig. 1

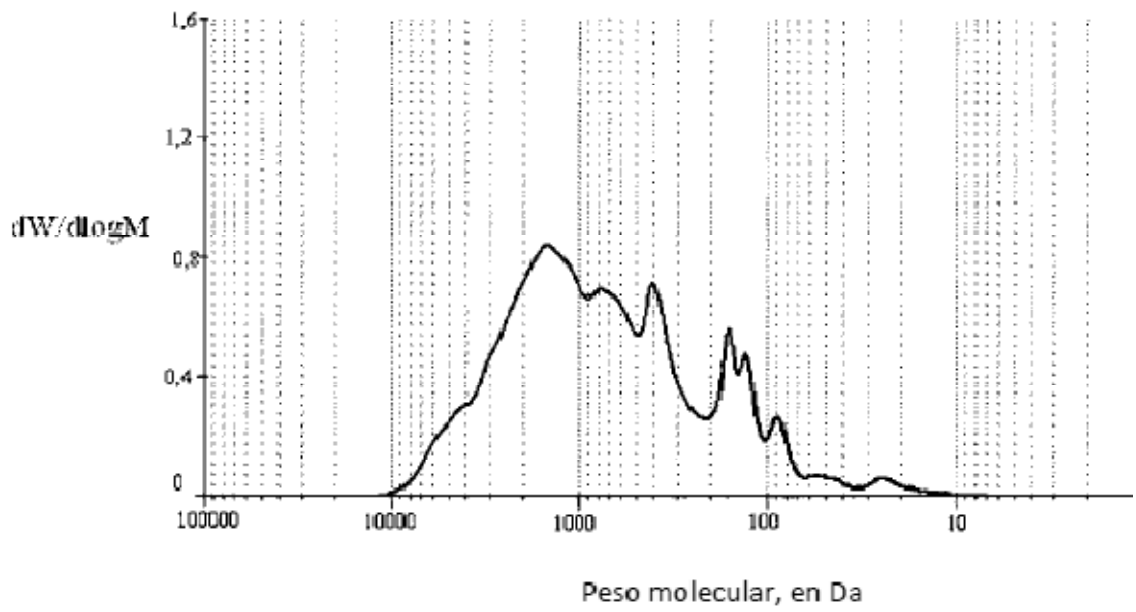


Fig. 2



Fig. 3

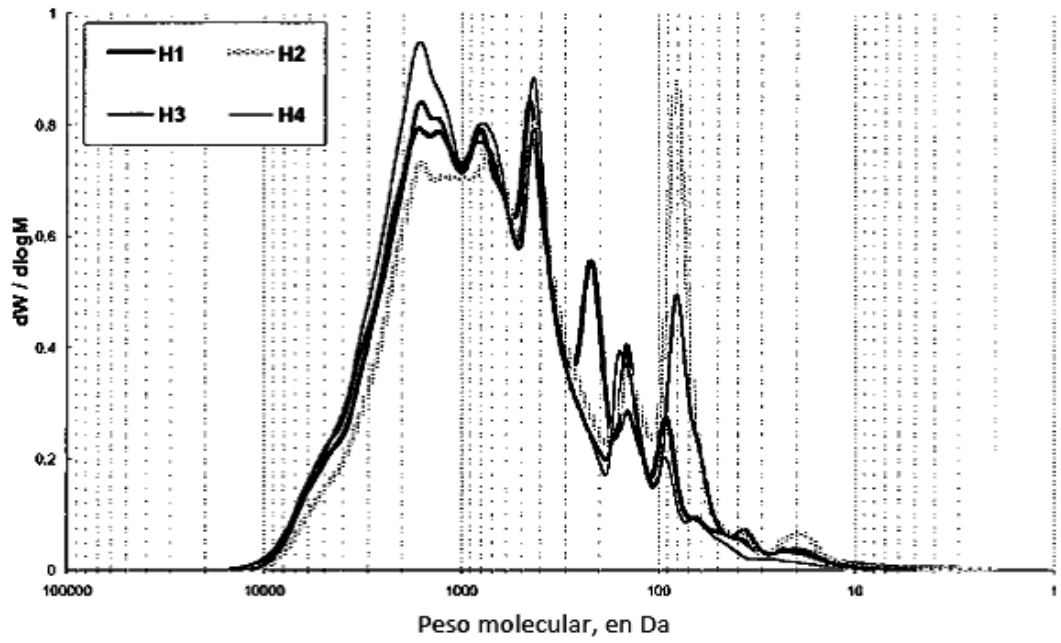
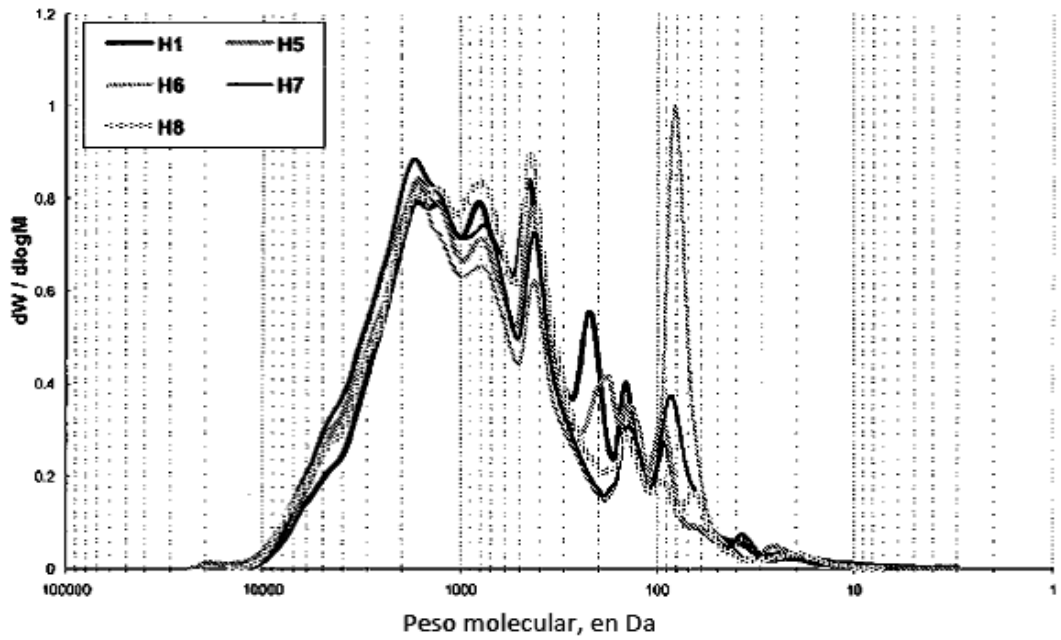


Fig. 4



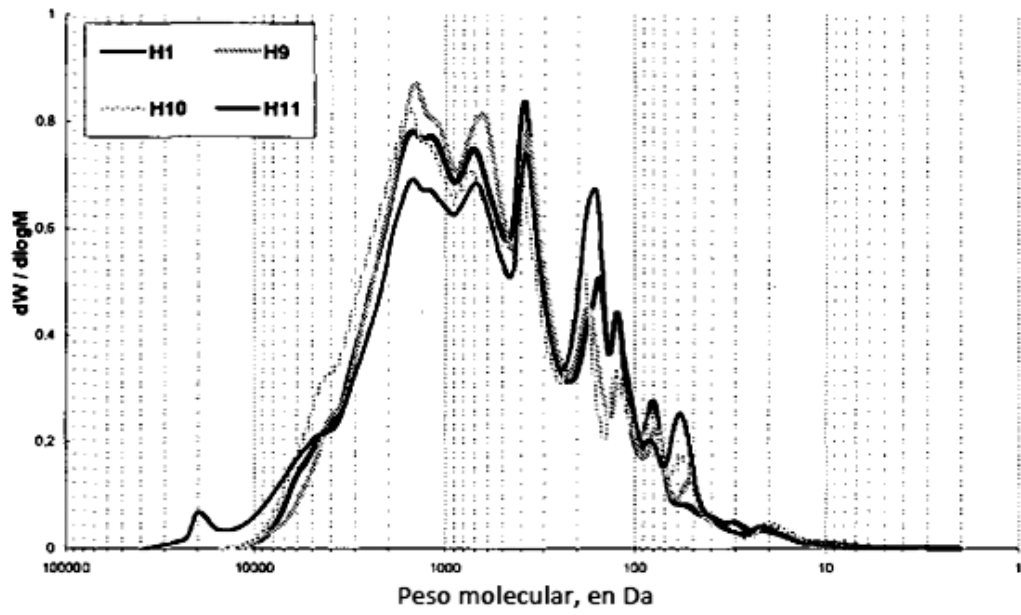


Fig. 5

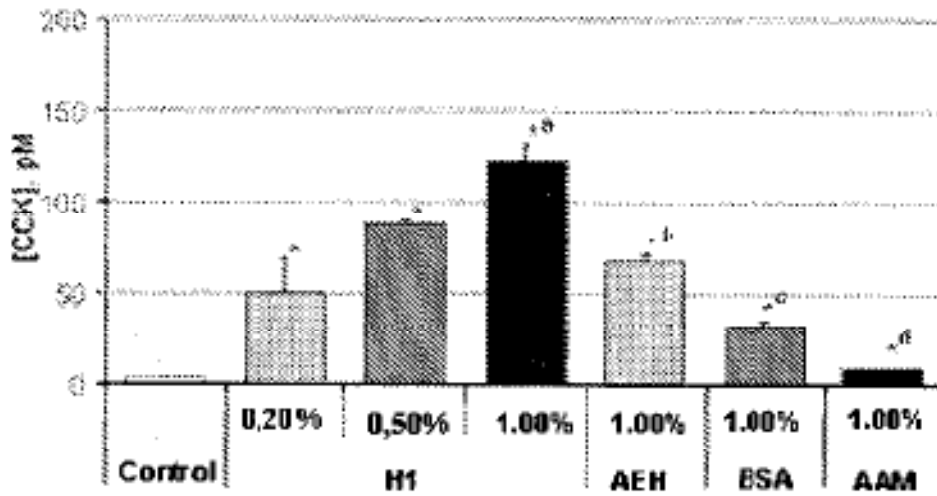


Fig. 6

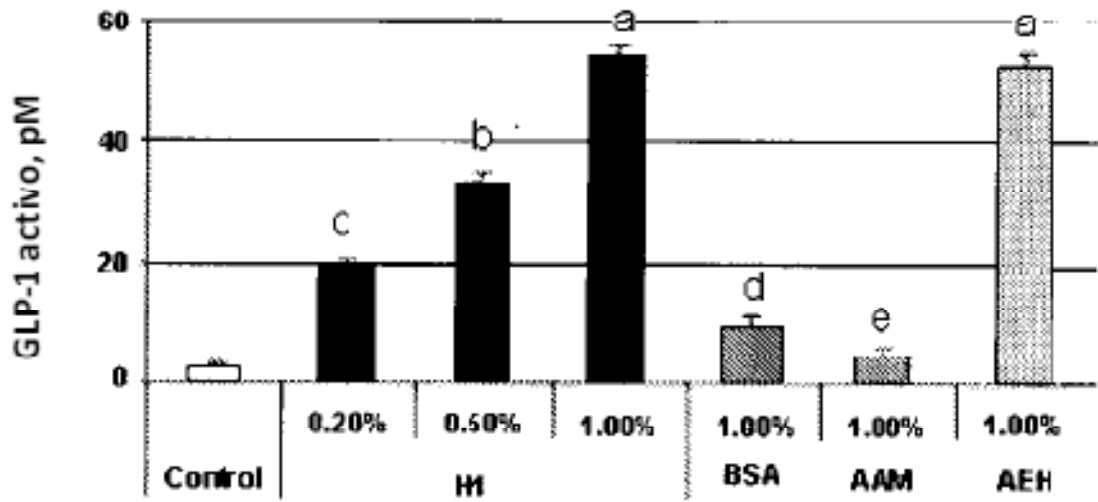


Fig. 7

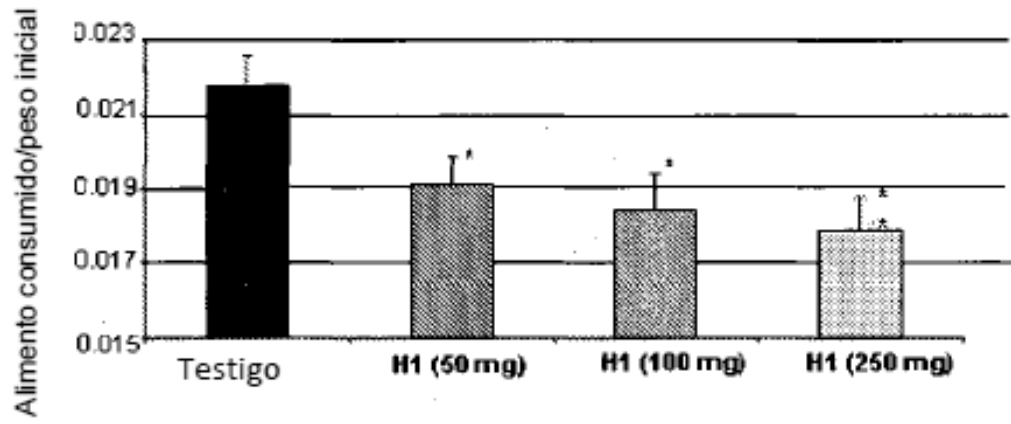


Fig. 8

Fig. 9

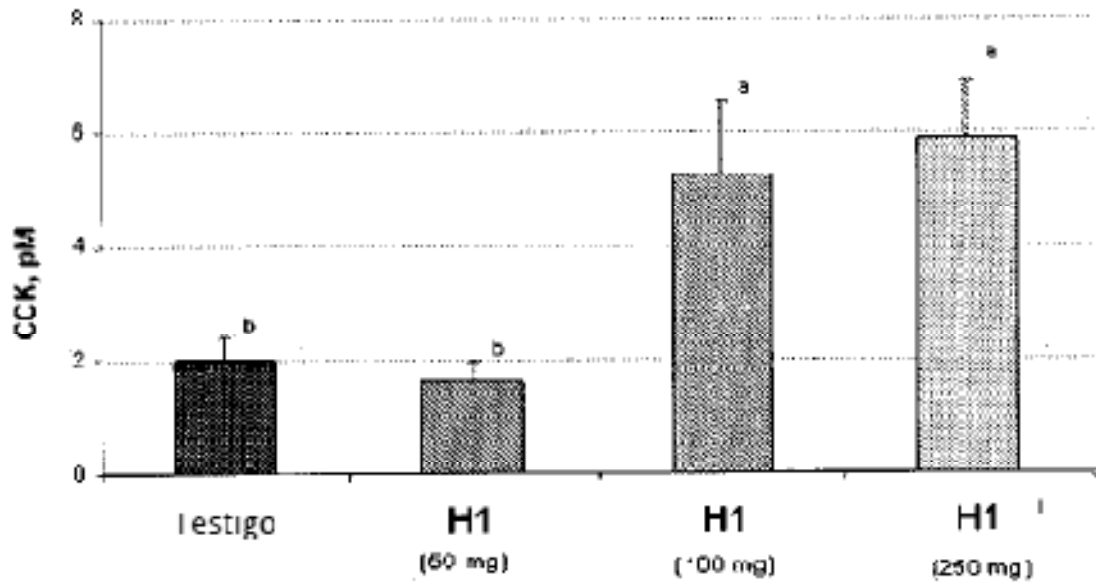


Fig. 10

