

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 171**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47	(2006.01)
A61K 38/01	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
A23L 33/18	(2006.01)
A61P 25/22	(2006.01)
A61P 25/20	(2006.01)
A61P 25/08	(2006.01)
A61K 38/08	(2006.01)
C12N 15/12	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2009 PCT/EP2009/056933**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2009 WO09147234**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2009 E 09757615 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2300039**

54 Título: **Composiciones ansiolíticas que comprenden péptidos derivados de la Caseína ALFAs1**

30 Prioridad:

06.06.2008 FR 0853757

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE (100.0%)
34 Cours Léopold, CS 25233
54052 Nancy Cedex, FR**

72 Inventor/es:

**BALANDRAS, FRÉDÉRIQUE;
GAILLARD, JEAN-LUC;
LAURENT, FRANÇOIS;
LE ROUX, YVES y
MICLO, LAURENT**

74 Agente/Representante:

ESPIELL VOLART, Eduardo María

ES 2 605 171 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones ansiolíticas que comprenden péptidos derivados de la caseína ALFA_{s1}

- 5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y a composiciones alimentarias que comprenden péptidos derivados de la caseína α_{s1} que tienen una actividad ansiolítica. La caseína da, por diversas técnicas de fraccionamiento, las principales fracciones que son denominadas respectivamente: caseína κ , caseína β , caseína α_{s1} y caseína α_{s2} . Las secuencias de aminoácidos de estas caseínas son bien conocidas, en particular la de la caseína α_{s1} que fue determinada por MERCIER *et al.* (1) y NAGAO *et al.* (2).
- 10 Se ha demostrado que ciertos fragmentos peptídicos de estas diferentes caseínas tienen actividades biológicas diversas y en particular actividades opiáceas o anti-opiáceas y actividades inhibitoras de la enzima convertidora de la angiotensina I. Por lo tanto, los péptidos 90-96 y 90-95 de la caseína α_{s1} tienen una actividad opiácea demostrando *in vitro* [ZIOUDROU *et al.* (3) y LOUKAS *et al.* (4)]. El residuo de arginina en la posición 90 parece ser importante para esta actividad opiácea. Los péptidos 91-95 y 91-96 en los cuales el residuo de arginina está suprimido son prácticamente inactivos y por lo tanto tienen una actividad opiácea muy inferior a la de los péptidos 90-96. Los péptidos 23-34 y 194-199, por su parte, son inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina I [MARUYAMA y SUZUKI (5) y MARUYAMA *et al.* (6)].
- 15 Un péptido que presentaba una actividad original de tipo ansiolítico se puso de manifiesto en un hidrolizado de caseína α_{s1} tripsico [EP 0714910 (7)] el que correspondía al fragmento 91-100 y que se denominó α -casozepina [MICLO *et al.* (8)]. Guesdon *et al.* (18) igualmente demostraron que este mismo hidrolizado tripsico de la caseína, que comprende 91-100 péptidos, mejora el sueño en ratas sometidas a un estrés crónico. La estructura de este decapeptido ha sido estudiado mediante RMN ¹H bidimensional. La secuencia comprendida entre los residuos de glicina 93 y de leucina 99 adopta, en medio micelar, una estructura helicoidal ₃₋₁₀ iniciada y terminada por un giro de hélice α . Las cadenas laterales de los residuos hidrófobos se sitúan sobre la misma cara de la hélice, mientras que las cadenas laterales de los residuos hidrófilos se sitúan sobre la otra cara, lo que confiere al péptido un carácter anfífilo y le puede permitir unas interacciones con las membranas. Las interacciones iónicas entre el grupo de guanidinio del resto de arginina 100 y los grupos carboxílicos de los residuos de ácido glutámico 96 y de arginina 100 muestran el papel fundamental del residuo de arginina carboxi-terminal en la estabilización de la estructura helicoidal. En una estructura de este tipo, los anillos aromáticos de los dos residuos de tirosina en las posiciones 91 y 94 están orientados de un modo tal que la distancia entre su centro (0,56 nm de media) es comparable a la distancia observada entre los centros de los anillos aromáticos del nitrazepam, benzodiazepina conocida por sus propiedades ansiolíticas [LECOUVEY *et al.* (9)]. La sustitución del residuo de arginina 100 por un residuo de alanina disminuye en gran medida la helicidad del decapeptido y el resultado es una disminución de la afinidad de este péptido con respecto al sitio de benzodiazepina del receptor GABA_A de un factor 300.000 [Tesis de Céline Frochot, (10)]. Este decapeptido, después de absorción oral, puede experimentar unos ataques proteolíticos por las enzimas del tracto digestivo lo que puede disminuir su biodisponibilidad y en consecuencia impedir que alcance su diana biológica. Sin embargo, es bien conocido que, para los péptidos pequeños, la absorción de los enterocitos es más eficaz que la de los fragmentos más grandes y que su resistencia con respecto a las proteasas digestivas aumenta. Por lo tanto, entre los fragmentos generados durante la digestión del decapeptido, algunos de ellos podrían ser más absorbibles y más resistentes, pero a la vista los datos estructurales procedentes del decapeptido, incapaces de mantener cualquier actividad de tipo ansiolítico.
- 20 La solicitud de patente pendiente PCT/EP2007/063863 muestra de manera sorprendente que los péptidos 91-97, 91-98, 91-99 derivados del decapeptido y que no contienen el residuo fundamental de arginina 100, muestran propiedades ansiolíticas en los ensayos de comportamiento *in vivo* en ratas. A la vista de su pequeño tamaño, estos péptidos se pueden absorber más fácilmente y se pueden degradar menos fácilmente.
- 25 La presente solicitud se refiere ahora a composiciones farmacéuticas y a productos alimentarios que tienen unas propiedades ansiolíticas que comprenden los 91-95 y 91-96 péptidos derivados de la caseína α_{s1} . Las propiedades ansiolíticas de estos péptidos se han de podido demostrar en ensayos de comportamiento *in vivo* en ratas.

Listado de secuencias

SEQ ID NO. 1: Pentapéptido que corresponde a las posiciones 91-95 de la caseína α_{s1}

SEQ ID NO. 2: Hexapéptido que corresponde a las posiciones 91-96 de la caseína α_{s1} .

60

Descripción de la invención

La invención tiene como objeto composiciones farmacéuticas que comprenden, a modo de principio activo, una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1 en combinación con un vehículo farmacéutico apropiado.

65

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención tienen una actividad de tipo benzodiazepina y de forma más particular son convenientes para el tratamiento de la ansiedad, de los trastornos del sueño y de la epilepsia.

5 En un modo de realización en particular, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un hidrolizado o una fracción de un hidrolizado de la caseína o de la caseína α_s1 , conteniendo una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1

La invención también se refiere a un producto alimentario para las personas propensas en particular a la ansiedad, a los trastornos del sueño y/o a la epilepsia que comprende una cantidad eficaz de al menos un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1.

10 En un modo de realización ventajosa de la invención, el producto alimentario comprende un hidrolizado o una fracción de un hidrolizado de la caseína o de la caseína α_s1 , que contiene una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1.

La invención también tiene como objeto los polinucleótidos aislados que codifican un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1.

15 La invención se refiere igualmente a vectores de expresión que comprenden un polinucleótido de acuerdo con la invención.

Otro objeto de la invención es un organismo huésped, excluyendo al ser humano, transformado con un polinucleótido de acuerdo con la invención y/o con un vector de expresión de acuerdo con la invención.

20 La invención tiene igualmente como objeto un organismo huésped transformado, excluyendo al ser humano, que expresa un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1.

La invención también se refiere a la utilización de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1, un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 2, un polinucleótido de acuerdo con la invención, un vector de expresión de acuerdo con la invención y/o un organismo huésped de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la ansiedad, los trastornos del sueño y la epilepsia.

25 Preferentemente, la invención se refiere a la utilización de un hidrolizado de la caseína o de caseína α_s1 y/o de una fracción de un hidrolizado de caseína o de caseína α_s1 que contiene una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1 y/o un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la ansiedad, de los trastornos del sueño y de la epilepsia.

Preferentemente el medicamento tiene una actividad de tipo benzodiazepina.

30 Otro objeto de la invención es la utilización de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1, de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 2, de un polinucleótido de acuerdo con la invención, de un vector de expresión de acuerdo con la invención y/o de un organismo huésped de acuerdo con la invención para la fabricación de un producto alimentario para las personas propensas en particular a la ansiedad, a los trastornos del sueño y/o la epilepsia.

35 De manera preferente, la invención tiene como objeto la utilización de un hidrolizado de la caseína o de la caseína α_s1 y/o de una fracción de un hidrolizado de la caseína o de la caseína α_s1 que contiene una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1 y/o de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 2 para la fabricación de un producto alimentario para las personas propensas en particular a la ansiedad, a los trastornos del sueño y/o la epilepsia.

40 Por lo tanto, la presente invención tiene como objeto composiciones farmacéuticas y productos alimentarios que comprenden los péptidos derivados de la caseína α_s1 cuya secuencia se representa en la SEQ ID NO. 1. Por lo tanto, la invención se refiere pues a composiciones farmacéuticas y productos alimentarios que contienen péptidos cuya secuencia de aminoácidos se escoge entre: Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu.

45 La invención se refiere igualmente a composiciones farmacéuticas y a los productos alimentarios que comprenden péptidos modificados que tienen la SEQ ID NO. 1 y que conservan sus propiedades ansiolíticas. La invención igualmente se refiere a composiciones farmacéuticas y a los productos alimentarios que comprenden proteínas de fusión o proteínas recombinantes que comprenden el péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1

50 En un segundo aspecto, la invención se refiere a los polinucleótidos que codifican los péptidos de acuerdo con la SEQ ID No. 1. Debido a la degeneración del código genético, diferentes polinucleótidos pueden codificar un mismo péptido. De acuerdo con la presente invención, se entiende por "polinucleótido" a una cadena nucleotídica de una sola hebra o su complementaria que puede ser de tipo ADN o ARN, o una cadena de nucleotídica de doble hebra que puede ser de tipo ADNc (complementario) o genómica. Preferentemente, los polinucleótidos de la invención son de tipo ADN, en particular de ADN de doble hebra. El término "polinucleótido" designa igualmente a los polinucleótidos modificados. Preferentemente, los polinucleótidos de la presente invención pueden ser preparados con las técnicas clásicas de biología molecular tal como se han descrito por Sambrook *et al.*, (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989) o por síntesis química.

55 Otro objeto de la invención es un organismo huésped que expresa un péptido de acuerdo con la SEQ ID NO. 1. Los péptidos de acuerdo con la SEQ ID No. 1 id la SEQ ID No. 2 se pueden expresar y producir en diferentes organismos huéspedes de acuerdo con técnicas bien conocidas por el experto en la materia. Normalmente, el organismo huésped se transforma con un casete de expresión que

- comprende un polinucleótido que codifica un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1 o la SEQ ID No. 2. Este polinucleótido puede ser integrado en el genoma del organismo huésped o se puede replicar de manera estable en el organismo huésped. Por organismo huésped se entiende en particular de acuerdo con la invención a cualquier organismo mono o pluricelular, inferior o superior, elegido en particular entre las bacterias, las levaduras, los hongos y los mamíferos. Por organismo huésped se entiende a un organismo no humano. Los péptidos de acuerdo con la SEQ ID No. 1 o la SEQ ID No. 2 por tanto, pueden ser producidos aislados o purificados a partir de organismos huéspedes transformados que los expresan.
- Preferentemente, los péptidos de acuerdo con la SEQ ID No. 1 o la SEQ ID No. 2 son obtenidos a partir de la caseína de la leche y más preferentemente a partir de la caseína α_s1 . La caseína usada es de preferencia la caseína de la leche de bovinos y de manera más preferente de vacas lecheras (*Bos taurus*). En la base de datos de Swiss Prot se hace referencia a la secuencia de la caseína α_s1 con el número P02662. Después del fraccionamiento de las proteínas de la leche, la caseína se «digiere» o hidroliza con unas enzimas apropiadas para obtener los péptidos de acuerdo con la invención. En un primer modo de realización, la caseína de la leche se hidroliza directamente con enzimas para obtener los péptidos deseados. En este modo de realización, puede ser necesario purificar parcial o totalmente los péptidos de acuerdo con la SEQ ID No. 1 o la SEQ ID No. 2 después de la hidrólisis. En un segundo modo de realización de acuerdo con la invención, la hidrólisis enzimática se efectúa directamente sobre la caseína α_s1 . En este modo de realización, el hidrolizado obtenido será ya enriquecido con péptidos de acuerdo con la SEQ ID No. 1 y a menudo no son necesarias etapas de purificación complementarias. El experto en la materia escogerá las enzimas apropiadas para obtener los péptidos deseados. Estas técnicas son bien conocidas por el experto en la materia y se describen en la bibliografía. La solicitud descrita tiene igualmente como objeto un hidrolizado de caseína que comprende un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1 o la SEQ ID No. 2. Preferentemente, se trata de un hidrolizado de caseína α_s1 .
- Las composiciones farmacéuticas y los productos alimentarios de acuerdo con la presente invención tienen una actividad de tipo benzodiazepina y en particular un efecto ansiolítico. La invención se refiere a composiciones farmacéuticas que tienen una actividad de tipo benzodiazepina en particular para el tratamiento de la ansiedad, de los trastornos del sueño, de la epilepsia.
- La invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que contienen, a modo de principio activo, una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1 en combinación con un vehículo farmacéutico apropiado.
- Estas composiciones pueden ser formuladas para la administración a los mamíferos, incluyendo al ser humano. La posología varía de acuerdo con el tratamiento y de acuerdo con la afectación en cuestión. Estas composiciones se realizan de modo que se puedan administrar por vía digestiva o parenteral.
- En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo se puede administrar en formas unitarias de administración, en mezcla con soportes farmacéuticos clásicos, a los animales o a seres humanos. Las formas unitarias de administración apropiadas comprenden las formas por vía oral tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos y soluciones o suspensiones orales, formas de administración sublingual y bucal, formas de administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intranasal o intraocular y formas de administración rectal.
- Cuando se prepara una composición sólida en forma de comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un vehículo farmacéutico tal como la gelatina, el almidón, la lactosa, el estearato de magnesio, el talco, la goma arábiga o análogos. Los comprimidos se pueden revestir con sacarosa u otros materiales apropiados o incluso se pueden tratar de tal modo que tengan una actividad prolongada o retardada y para que liberen de una forma continua una cantidad predeterminada de principio activo.
- Se obtiene una preparación en cápsulas mezclando el principio activo con un diluyente y vertiendo la mezcla obtenida en unas cápsulas blandas o duras.
- Una preparación en forma de jarabe o de elixir puede contener el principio activo en conjunto con un edulcorante, un antiséptico, así como un agente que proporcione sabor y un colorante apropiado.
- Los polvos o gránulos dispersables en agua pueden contener el principio activo en mezcla con agentes de dispersión o con agentes humectantes, o unos agentes de suspensión, así como con unos correctores del sabor o edulcorantes.
- Las composiciones de acuerdo con la invención se pueden usar en terapias solas, o en combinación con al menos otro agente activo. Estos otros agentes activos son elegidos en particular entre los agentes activos apropiados para el tratamiento de la ansiedad, los trastornos del sueño y la epilepsia. Se puede tratar de adyuvantes que permitan mejorar la actividad de los compuestos de acuerdo con la invención, o incluso otros agentes activos conocidos por su uso en el tratamiento de dichas afecciones. Los agentes activos de este tipo son bien conocidos por el experto en la materia, estando disponibles en el mercado o incluso descritos en obras de referencia tales como el Diccionario Vidal, editado con actualizaciones cada año.
- La presente invención se refiere igualmente pues a una composición farmacéutica que comprende un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1 así como otro agente activo como producto de combinación

para una utilización simultánea, separada o escalonada en el tiempo en terapia, y en particular en el tratamiento de la ansiedad y los trastornos del sueño. Estos otros agentes activos se eligen en particular entre los agentes activos apropiados para el tratamiento de la ansiedad como por ejemplo los compuestos de la clase de las benzodiazepinas o los inhibidores de la recaptación de serotonina.

- 5 La invención se refiere también a la utilización de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1, de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 2, de un polinucleótido de acuerdo con la invención, de un vector de expresión de acuerdo con la invención y/o de un organismo huésped de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la ansiedad, de los trastornos del sueño y de la epilepsia.
- 10 Preferentemente, la invención se refiere a la utilización de un hidrolizado de la caseína o de la caseína α_s1 y/o de una fracción de un hidrolizado de la caseína o de la caseína α_s1 , que contiene una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1 y/o de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la ansiedad, de los trastornos del sueño y de la epilepsia.
- 15 La invención también se refiere a métodos de tratamiento terapéutico de la ansiedad, de los trastornos del sueño y de la epilepsia que comprenden la administración a un individuo de una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1, de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 2, de un polinucleótido de acuerdo con la invención, de un vector de expresión de acuerdo con la invención y/o de un organismo huésped de acuerdo con la invención.
- 20 La solicitud se refiere también a métodos de tratamiento terapéutico de la ansiedad, de los trastornos del sueño y de la epilepsia que comprende la administración a un individuo de un hidrolizado de la caseína o de la caseína α_s1 y/o de una fracción de un hidrolizado de la caseína o de caseína α_s1 , que contiene una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1 y/o de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 2.
- 25 La solicitud descrita es la utilización de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1, de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 2, de un polinucleótido de acuerdo con la invención, de un vector de expresión de acuerdo con la invención y/o de un organismo huésped de acuerdo con la invención para la fabricación de un producto alimentario a las personas propensas en particular a la ansiedad, a los trastornos del sueño y/o a la epilepsia.
- 30 La solicitud describe un hidrolizado de la caseína o de la caseína α_s1 y/o de una fracción de un hidrolizado de la caseína o de caseína α_s1 que contiene una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1 y/o un péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 2 para la fabricación de un producto alimentario para las personas propensas en particular a la ansiedad, a los trastornos del sueño y/o a la epilepsia.
- 35 Por producto alimentario se entiende todo lo que sea apropiado para servir como alimento. Los péptidos de la SEQ ID No. 1 pueden ser utilizados como principio activo ya sea en productos alimentarios en combinación con suplementos alimentarios de naturaleza proteica, glúcidos o lípidos, ya sea en productos alimentarios destinados a una alimentación en particular. Los productos alimentarios de la presente invención también se pueden presentar en forma de complementos alimentarios. Estos complementos alimentarios convienen para suplementar la alimentación de personas propensas en particular a la ansiedad, a los trastornos del sueño y/o a la epilepsia.
- 40 La invención igualmente se refiere a procedimientos de obtención de los péptidos de la SEQ ID No. 1 y de la SEQ ID No. 2. La caseína entera se obtiene a partir de la leche por precipitación ácida y neutralización con ayuda de un álcali de acuerdo con los métodos bien conocidos. Por ejemplo, se puede utilizar el método de NITSCHMANN y LEHMANN (11). La caseína o la caseína α_s1 , utilizadas como producto de partida para la obtención de los péptidos de acuerdo con la SEQ ID No. 1 y la SEQ ID No. 2, se pueden obtener con los procedimientos clásicos bien conocidos por el experto en la materia a partir de la leche, de caseínas enteras, de caseinatos y de concentrados de proteínas totales de la leche, obtenidos por ejemplo de acuerdo con los procedimientos descritos por THOMSON (12) y MAUBOIS (13). Por ejemplo, la caseína α_s1 se puede preparar poniendo en práctica el método descrito por SANOGO *et al.* (14). Este método es un método de fraccionamientos sobre DEAE-celulosa que utiliza un gradiente discontinuo de cloruro cálcico como eluyente. Presenta la ventaja de separar rápidamente el conjunto de las caseínas. De forma ventajosa, se puede poner en práctica, como soporte de intercambio de aniones, con la DEAE-celulosa DE 52 [comercializada por
- 45 WHATMAN *Ltd*, Springfield, Gran Bretaña] que es una resina acondicionada previamente que no necesita ningún ciclo previo ácido-básico antes de su primera utilización. A continuación, los péptidos se pueden obtener por hidrólisis de la caseína con unas enzimas apropiadas. A continuación, los péptidos se pueden concentrar o aislar por cromatografía líquida de alto rendimiento (CLHP) en fase inversa, por cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico o por cromatografía de filtración en gel con un umbral de 1.000 Da o por centrifugación sobre membrana y otras técnicas de separación sobre membrana (microfiltración, ultrafiltración, etc.).
- 50 Por lo tanto, otro objeto de la presente invención es un procedimiento de preparación de péptidos que tengan una actividad de tipo benzodiazepina y en particular una actividad ansiolítica caracterizado porque comprende las etapas siguientes:
- 55
- 60
- 65 - hidrólisis enzimática de la caseína con ayuda de la tripsina y a continuación de la pepsina o de una mezcla de enzimas pancreáticas;

- aislamiento de los péptidos que tienen la SEQ ID No. 1.

Por aislamiento se entiende la purificación parcial o total de los péptidos o simplemente el enriquecimiento del hidrolizado obtenido en péptidos de acuerdo con la SEQ ID No.1 y la SEQ ID No. 2. Este enriquecimiento se puede realizar por ejemplo por fraccionamiento del hidrolizado obtenido.

5 Como alternativa, el hidrolizado obtenido a partir de la caseína α_s1 que contiene el péptido de acuerdo con la SEQ ID No. 1 puede ser utilizado directamente para la obtención de las composiciones farmacéuticas y de los productos alimentarios de acuerdo con la invención.

Los péptidos también se pueden obtener por síntesis peptídica de acuerdo con los procedimientos bien conocidos por el experto en la materia, tales como los descritos por ejemplo por MERIFFIELD

10 (15).

La invención se describirá ahora con más detalle con los ejemplos que siguen que no limitativos:

Figuras

Figura 1: Ensayo del laberinto en cruz sobreelevado

Figura 2: Ensayo de la caja clara/oscura.

15

Ejemplos

1. Modalidades de obtención de un pentapéptido

La caseína entera se obtiene a partir de la leche por precipitación ácida y neutralización con la ayuda de un álcali de acuerdo con los procedimientos bien conocidos.

20 El pentapéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que sigue a continuación: Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu de masa molecular de 627 Da, corresponde al péptido 91-95 de la caseína α_s1 . Se puede obtener a partir de la caseína α_s1 por hidrólisis enzimática, en particular con ayuda de la tripsina y a continuación de la pepsina. La hidrólisis por la tripsina de la caseína α_s1 libera fragmentos peptídicos diversos. El conjunto de los fragmentos tripticos experimenta una hidrólisis con la pepsina A (EC 3.4.23.1) (obtenida de mucosa gástrica porcina, con una actividad de 3.200-4.500 unidades/mg de proteína), en una proporción de E/S = 1/200 a un pH ácido, en un tampón y a una temperatura óptima para la actividad de la enzima durante 240 minutos. Esta última hidrólisis libera nuevos fragmentos entre los cuales está el pentapéptido 91-95 de la caseína α_s1 . Este pentapéptido también se genera a partir de los fragmentos tripticos de la caseína α_s1 mediante una hidrólisis con ayuda de la Corolase PP®, una mezcla de enzimas pancreáticas. La hidrólisis es realizada durante 240 min en una proporción de E/S = 1/100 a un pH, una temperatura y un tampón óptimo para esta mezcla enzimática. A continuación, el pentapéptido se puede concentrar o aislar por cromatografía líquida de alto rendimiento (CLHP) en fase inversa, por cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico o por cromatografía de filtración en gel o por centrifugación sobre membrana y otras técnicas de separación sobre membrana (microfiltración, ultrafiltración, etc.).

25

30

35

2. Estudios fármaco-comportamentales en ratas Wistar

2.1. Laberinto en cruz sobre elevado

2.1.1. Principio

El ensayo del laberinto en cruz sobreelevado permite medir la densidad del comportamiento exploratorio en una situación nueva aversiva [PELLOW *et al.*, 1985 (16)].

40

El experimento aprovecha el conflicto, en roedores, entre el miedo a los espacios abiertos y el deseo de explorar un nuevo entorno. La rata, colocada en el centro del dispositivo, se ve obligada a explorar su entorno. Los brazos abiertos constituyen un entorno ansiogénico, mientras que éste no es el caso de los brazos cerrados. El número de entradas en el conjunto de los brazos, el que se relaciona con los brazos abiertos, los brazos cerrados, el tiempo pasado los brazos abiertos, el estado de entrada en el primer brazo abierto constituyen los parámetros que reflejan el grado de ansiedad del animal.

45

2.1.2. Equipo

El laberinto en cruz, sobreelevado construido con madera, está formado por cuatro brazos a 90° los unos de los otros. Los dos brazos abiertos (45 x 10 cm) y los dos brazos cerrados (45 x 10 cm; rodeados de placas de madera a una altura de 40 cm) se colocan enfrentados. El cuadrado central mide 10 x 10 cm. Los brazos abiertos están iluminados con una luz blanca de una intensidad de 500 lux. El laberinto sobreelevado en cruz se encuentra a 50 cm del suelo.

50

2.1.3. Protocolo

Las observaciones tuvieron lugar entre las 9 h y 11 h de la mañana para minimizar la influencia del ritmo circadiano. Antes de cada paso a través del laberinto sobreelevado en cruz, el animal se coloca durante 10 minutos en un campo abierto con el fin de estimular su comportamiento exploratorio. A continuación se coloca en el cuadrado central del laberinto sobreelevado en cruz y es observado durante 5 min. El laberinto en cruz se lava con etanol al 95 % (v/v) entre dos pasos con el fin de eliminar los olores.

55

2.1.4. Tratamientos

60

El estudio se realizó en 45 ratas repartidas en tres grupos:

- un grupo de control (15 ratas) recibió 2 ml/kg de una solución que contenía un 1 % de glicerol (v/v) y un 0,2 % (v/v) de metilcelulosa (vehículo),
- un grupo tratado con diazepam (Valium®, Roche, Neuilly-sur-Seine, Francia) en una dosis de 1 mg/kg suspendido en el vehículo (15 ratas) como control positivo,
- 65 - un grupo tratado con el fragmento 91-95 de la caseína α_s1 , disuelto previamente en el vehículo, a

una dosis de 0,5 mg/kg (15 ratas).

Los animales recibieron su respectivo tratamiento por vía intraperitoneal una media hora antes del paso en el campo abierto.

2.1.5. Resultados

5 El efecto de la inyección intraperitoneal en ratas Wistar de 2 ml/kg de una solución que contenía un 1 % (v/v) de glicerol y un 0,2 % (v/v) de metilcelulosa (n = 15) o 1 mg/kg de diazepam (n = 15) o de 0,5 mg/kg del pentapéptido CN α_5 -f(91-95) (n = 15) con respecto a (i) el número total de entradas en los diferentes brazos, (ii) el número de entradas en los brazos abiertos, (iii) el tiempo empleado en los brazos abiertos se estudió mediante análisis de varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis) y las comparaciones medias se realizaron con el ensayo de Mann-Whitney (A, B medias para cada tratamiento significativamente diferentes $p < 0,05$, figura 1). La actividad exploratoria de los animales, que se refleja por el número de entrada en el conjunto de los brazos, no es significativamente diferente de acuerdo con el tratamiento. El número de entradas en los brazos abiertos y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos de los animales tratados con el vehículo son significativamente inferiores a los de los animales tratados con diazepam y a los de los animales tratados con el fragmento 91-95 de la caseína α_5 1. No se observa ninguna diferencia significativa entre el diazepam y el fragmento 91-95 de la caseína α_5 1. El fragmento 91-95 de la caseína α_5 1 presenta, en el ensayo del laberinto sobre elevado en cruz en ratas Wistar, una acción similar a la ejercida por el diazepam, es decir, un aumento de la exploración de zonas de áreas de exploración ansiogénicas.

2.2. Caja claro/oscuras

2.2.1. Principio

25 Los ensayos de claro/oscuras se basan en la aversión innata de los roedores hacia entornos muy iluminados y en su comportamiento exploratorio espontáneo como respuesta a factores de ligeros estrés como un nuevo entorno y la luz. El dispositivo de la caja de claro/oscuras permite estudiar el comportamiento exploratorio con respecto a un compartimento familiar aversivo (fuertemente iluminado con luz blanca) después de la aclimatación en un compartimento no aversivo (oscuro) que entonces se hace familiar [BOURIN y que HASCOËT, 2003 (17)]. Los ansiolíticos clásicos se pueden detectar usando este dispositivo.

2.2.2. Aparatos y protocolo

30 La caja claro/oscura mide 65 x 49 x 35 cm (h x L x l) y está dividida en dos compartimentos idénticos por una placa perforada de tres puertas de 8 x 8 cm. El suelo está recubierto de serrín. Cada rata es colocada durante 24 h en el compartimento posterior de la caja, estando las puertas de comunicación con el compartimento delantero inaccesibles. De este modo, el compartimento trasero llega a ser familiar. El animal se alimenta y se hidrata a voluntad. El día del ensayo, la rata, después del tratamiento, se vuelve a colocar en el compartimento familiar y las puertas que se comunican con el compartimento delantero (no familiar) se hacen accesibles para que el animal pueda explorar libremente el entorno. El compartimento no familiar se hace aversivo por una iluminación con luz blanca de una intensidad de 1500 lux. Los animales se observan durante 10 min y se mide el tiempo pasado en cada uno de los compartimentos.

2.2.3. Tratamientos

El estudio se realizó sobre 36 ratas repartidas en tres grupos:

- un grupo de control (12 ratas) que recibió 2 ml/kg de una solución que contenía un 1 % de glicerol (v/v) y un 0,2 % (v/v) de metilcelulosa (vehículo),
- 45 - un grupo tratado con diazepam (Valium[®], Roche, Neuilly-sur-Seine, Francia) en una dosis de 1 mg/kg suspendido en el vehículo (12 ratas) como control positivo,
- un grupo tratado con el fragmento 91-95 de la caseína α_5 1, disuelto previamente en el vehículo, a una dosis de 0,5 mg/kg (12 ratas).

Los animales recibieron su respectivo tratamiento por vía intraperitoneal una media hora antes de la apertura de la comunicación entre el compartimento familiar y el compartimento no familiar.

2.2.4. Resultados

50 El efecto de la inyección intraperitoneal en ratas Wistar de 2 ml/kg de una solución que contenía un 1 % (v/v) de glicerol y un 0,2 % (v/v) de metilcelulosa (n = 12) o 1 mg/kg de diazepam (n = 12) o 0,5 mg/kg del pentapéptido CN α_5 -f(91-95) (n = 12) con respecto a (i) el número de entradas en el compartimento no familiar, (ii) el número de entradas pasado en el compartimento familiar y (iii) el tiempo pasado en el compartimento no familiar se estudió mediante análisis de varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis) y las comparaciones medias se realizaron con el ensayo de Mann-Whitney (A, B medias para cada tratamiento significativamente diferentes $p < 0,05$, figura 2). El tiempo pasado en el compartimento no familiar, aversivo, de los animales tratados con el vehículo es significativamente inferior al de los animales tratados con diazepam y al de los animales tratados con el fragmento 91-95 de la caseína α_5 1. En paralelo, el tiempo pasado en el compartimento familiar de los animales tratados con el vehículo aumenta significativamente. No se observa ninguna diferencia significativa entre el diazepam y el fragmento 91-95 de la caseína α_5 1. El fragmento 91-95 de la caseína α_5 1 muestra una acción, de tipo ansiolítico, similar a la del diazepam en el ensayo de la caja claro/oscura en ratas Wistar.

65

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 5 (1) MERCIER, J.C., GROSCLAUDE, F., y RIBADEAU-DUMAS, B., 1971, Structure primaire de la caséine α_1 bovine. Séquence complète. Eur. J. Biochem., 23, 41-51.
- (2) NAGAO, M., MAKI, M., SASAKI, R., y CHIBA, H., 1984, Isolation and sequence analysis of bovine α_1 -casein cDNA clone. Agric. Biol. Chem., 48, 1663-1667.
- (3) ZIOUDROU, C., STREATY, R.A., y KLEE, W.A., 1979, Opioid peptides derived from food proteins: the exorphins. J. Biol. Chem., 254, 2446-2449.
- 10 (4) LOUKAS, S., VAROUCHEA, D., ZIOUDROU, C., STREATY, R.A., y KLEE, W.A., 1983, Opioid activities and structure of α -casein-derived exorphins. Biochemistry, 22, 4567-4573.
- (5) MARUYAMA, S., y SUZUKI, H., 1982, A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. Agric. Biol. Chem., 46, 1393-1394.
- (6) MARUYAMA, S., MITACHI, H., AWAYA, J., KURONO, M., TOMIZUKA, N., y SUZUKI, H., 1987, Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α_1 -casein. Agric. Biol. Chem., 51, 2557-2561.
- 15 (7) MICLO, L., PERRIN, E., DRIOU, A., BOUDIER, J.-F., IUNG, C., y LINDEN G., 1995, Utilisation d'un décapeptide à activité de type benzodiazépine pour la préparation de médicaments et de compléments alimentaires. Patente europea n.º EP 0714910A1.
- (8) MICLO, L., PERRIN, E., DRIOU, A., PAPADOPOULOS, V., BOUJRAD, N., VANDERESSE, R., BOUDER, J.-F., DESOR, D., LINDEN, G., y GAILLARD, J.-L., 2001, Characterization of α -casozepine, a tryptic peptide from bovine α_1 -casein with benzodiazepine-like activity. FASEB J. (8 de junio, 2001) 10.1096/fj.00-0685fje.
- (9) LECOUCVEY, M., FROCHOT, C., MICLO, L., ORLEWSKI, P., DRIOU, A., LINDEN, A., GAILLARD, J.-L., MARRAUD, M., CUNG, M.-T. y VANDERESSE R., 1997, Two dimensional 1H-NMR and CD structural analysis in a micellar medium of a bovin α_1 -casein fragment having benzodiazepine-like properties. Eur. J. Biochem., 248, 872-878.
- 25 (10) FROCHOT, C. 1998, Étude d'un décapeptide à activité de type benzodiazépine issu d'une protéine du lait bovin. Thèse de l'Institut Polytechnique de Lorraine (INPL).
- (11) NITSCHMANN, H.S., y LEHMANN, W., 1947, Zum Problem der Labwirkung auf Casein, Helv. Chim. Acta, 130, 804.
- (12) THOMSON, A.R., 1984, Recent developments in protein recovery and purification. J. Chem. Tech. Biotechnol., 34B, 190-198.
- (13) MAUBOIS, J.L., 1984. Separation, extraction and fractionation of milk protein components. Lait, 64, 485-495.
- 35 (14) SANOGO, T., PÂQUET, D., AUBERT, F., y LINDEN, G., 1989, Purification of α_1 -casein by Fast Protein Liquid Chromatography. J. Dairy Sci., 72, 2242-2246.
- (15) MERRIFIELD, R.B., 1963, Solid phase peptide synthesis. I. Synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc., 85, 2149-2154.
- (16) PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E., y BRILEY, M., 1985, Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J. Neurosci. Methods, 14, 149-167.
- (17) BOURIN, M., y HASCOËT, M., 2003, The mouse light/dark box test. Eur. J. Pharmacol., 463, 55-65.
- 45 (18) Guesdon *et al.*, 2006, A tryptic hydrolysate from bovine milk alpha S1-casein improves sleep in rats subjected to chronic mild stress, 27: 6, 1476-1482.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> Instituto Nacional Politécnico de la Universidad Henri-Poincaré Nancy 1 de Lorraine
- <120> Composiciones ansiolíticas que comprenden los péptidos derivados de la caseína alfa S1
- 55 <130> 354723 D26668
- <150> FR 0853757
- <151> 06-06-2008
- 60 <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 5

ES 2 605 171 T3

<212> PRT
<213> *Bos taurus*

5

<400> 1

Tyr Leu Gly Tyr Leu
1 5

10

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> *Bos taurus*
<400> 2

Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu
1 5

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un péptido de acuerdo con la SEQ ID N° 1 y/o un péptido de acuerdo con la SEQ ID N° 2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la ansiedad, de los trastornos del sueño y de la epilepsia.
- 10 2. Utilización de un hidrolizado de la caseína o de la caseína α_{s1} y/o de una fracción de hidrolizado de la caseína o de la caseína α_{s1} , que contiene una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la SEQ ID N° 1 y/o un péptido de acuerdo con la SEQ ID N° 2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la ansiedad, de los trastornos del sueño y de la epilepsia.
- 15 3. Composición que comprende, a modo de principio activo, una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la SEQ ID N° 1 para su utilización en terapia.
- 20 4. Composición para utilización en el tratamiento de la ansiedad, de los trastornos del sueño y de la epilepsia **caracterizada porque** comprende un hidrolizado o una fracción de un hidrolizado de caseína o de caseína α_{s1} que contiene una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la SEQ ID N° 1 y/o un péptido de acuerdo con la SEQ ID N° 2.
- 25 5. Composición para utilización de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4 **caracterizada porque** comprende un vehículo farmacéutico apropiado.
- 30 6. Composición para utilización de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4 **caracterizada porque** es un producto alimentario.
- 35 7. Producto alimentario **caracterizado porque** comprende una cantidad eficaz para el tratamiento de la ansiedad, de los trastornos del sueño y de la epilepsia de al menos un péptido de acuerdo con la SEQ ID N° 1.
- 40 8. Producto alimentario de acuerdo con la reivindicación 7 **caracterizado porque** comprende un hidrolizado o una fracción de un hidrolizado de la caseína o de la caseína α_{s1} , que contiene una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la SEQ ID N° 1.
- 45 9. Procedimiento de preparación de un hidrolizado de la caseína o de la caseína α_{s1} , que contiene una cantidad eficaz de un péptido de acuerdo con la SEQ ID N° 1, que comprende:
 - una etapa de hidrólisis enzimática con la ayuda de la tripsina y a continuación de la pepsina o de una mezcla de enzimas pancreáticas, y
 - una etapa de aislamiento o de concentración por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa, por cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico, por cromatografía de filtración en gel con un umbral de 1000 Da o por una técnica de separación sobre membrana.
- 50 10. Polinucleótido aislado **caracterizado porque** codifica un péptido de acuerdo con la SEQ ID N° 1.
- 55 11. Vector de expresión **caracterizado porque** comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Organismo huésped, excepto del ser humano, **caracterizado porque** es transformado por un polinucleótido que es codificado por un péptido de acuerdo con la SEQ ID N° 1, y/o con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica por un péptido de acuerdo con la SEQ ID N° 1.
13. Organismo huésped transformado, excluyendo al ser humano, **caracterizado porque** expresa un péptido de acuerdo con la SEQ ID N° 1.

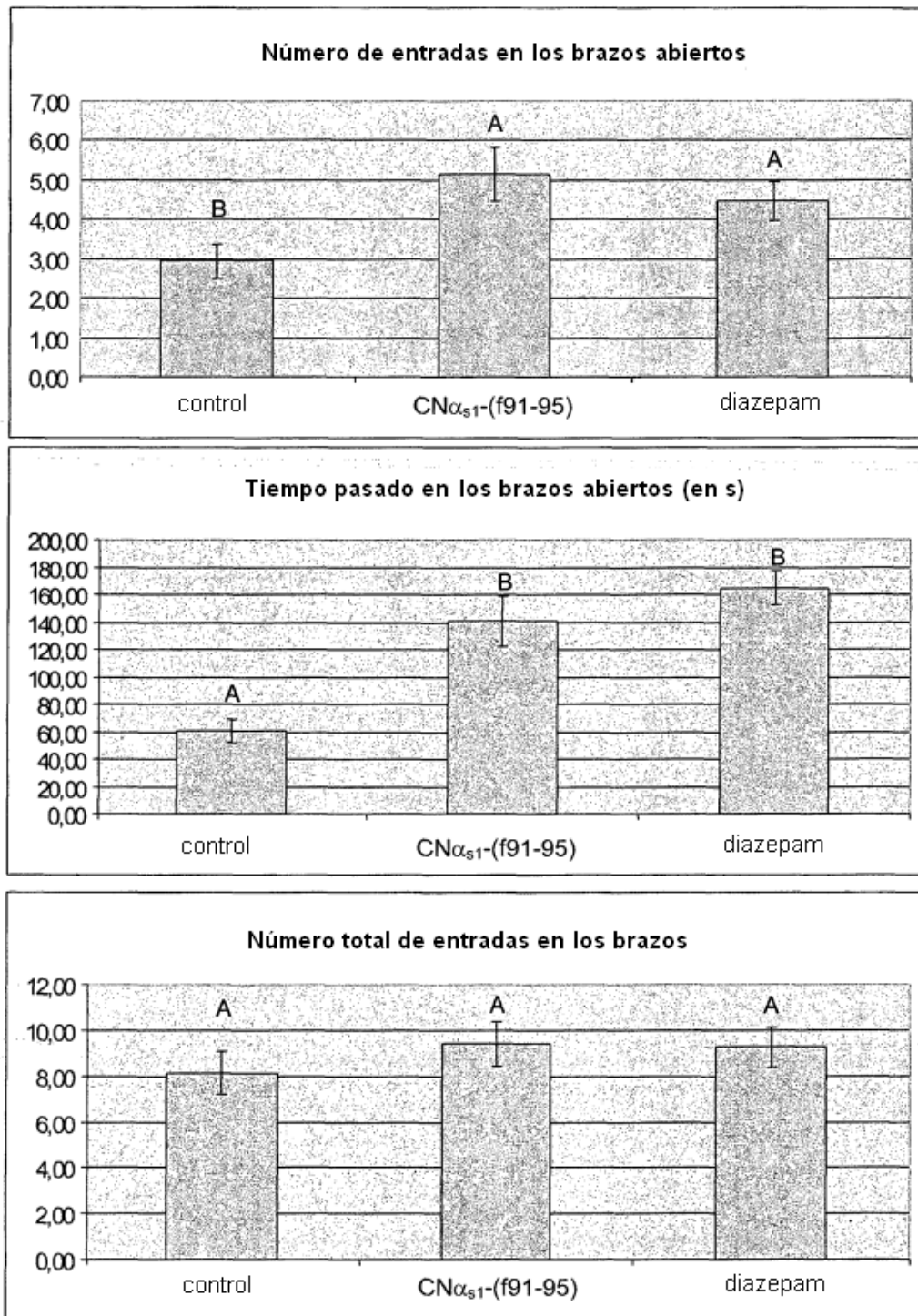


Fig. 1

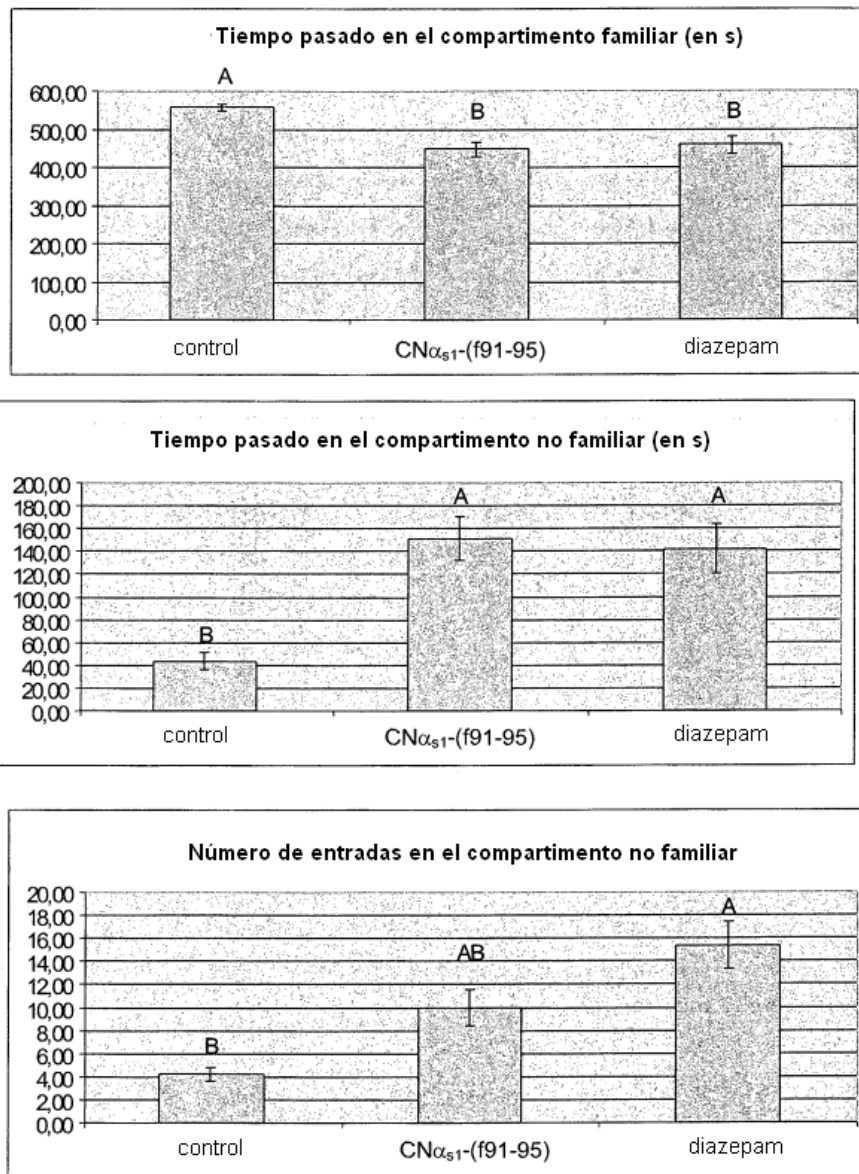


Fig. 2

DOCUMENTOS INDICADOS EN LA DESCRIPCIÓN

En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPO no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones.

Documentos de patente indicados en la descripción

- EP 07149107 A [0004]
- EP 2007063863 W [0005]
- EP 0714910 A1 [0065]
- FR 0853757 [0066]

Bibliografía no especificada en la descripción de la patente

- **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 1989 [0024]
- **MERCIER, J.C. ; GROSCLAUDE, F. ; RIBADEAU-DUMAS, B.** Structure primaire de la caséine α s1 bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.*, 1971, vol. 23, 41-51 [0065]
- **NAGAO, M. ; MAKI, M. ; SASAKI, R. ; CHIBA, H.** Isolation and sequence analysis of bovine α s1-casein cDNA clone. *Agaric. Biol. Chem.*, 1984, vol. 48, 1663-1667 [0065]
- **ZILOUDROU, C. ; STREATY, R.A. ; KLEE, W.A.** Opioid peptides derived from food proteins: the exorphins. *J. Biol. Chem.*, 1979, vol. 254, 2446-2449 [0065]
- **LOUKAS, S. ; VAROUCHEA, D. ; ZILOUDROU, C. ; STREATY, R.A. ; KLEE, W.A.** Opioid activities and structure of α -casein-derived exorphins. *Biochemistry*, 1983, vol. 22, 4567-4573 [0065]
- **MARUYAMA, S. ; SUZUKI, H.** A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, 1982, vol. 46, 1393-1394 [0065]
- **MARUYAMA, S. ; MITACHI, H. ; AWAYA, J. ; KURONO, M. ; TOMIZUKA, N. ; SUZUKI, H.** Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α s1-casein. *Agric. Biol. Chem.*, 1987, vol. 51, 2557-2561 [0065]
- **MICLO, L. ; PERRIN, E. ; DRIOU, A. ; PAPA-DOPOULOS, V. ; BOUJRAD, N. ; VANDERESSE, R. ; BOUDER, J.-F. ; DESOR, D. ; LINDEN, G. ; GAILLARD, J.-L.** Characterization of α -casozepine, a tryptic peptide from bovine α s1-casein with benzodiazepine-like activity. *FASEB J.*, 08 Juin 2001 [0065]
- **LECOUVEY, M. ; FROCHOT, C. ; MICLO, L. ; ORLEWSKI, P. ; DRIOU, A. ; LINDEN, A. ; GAILLARD, J.-L. ; MARRAUD, M. ; CUNG, M.-T. ; VANDERESSE R.** Two dimensional H-NMR and CD structural analysis in a micellar medium of a bovin α s1-casein fragment having benzodiazepine-like properties. *Eur. J. Biochem.*, 1997, vol. 248, 872-878 [0065]
- **FROCHOT, C.** Étude d'un décapeptide à activité de type benzodiazépine issu d'une protéine du lait bovin. *Thèse de l'Institut Polytechnique de Lorraine (INPL)*, 1998 [0065]
- **NITSCHMANN, H.S. ; LEHMANN, W.** Zum Problem der Labwirkung auf Casein. *Helv. Chim. Acta*, 1947, vol. 130, 804 [0065]
- **THOMSON, A.R.** Recent developments in protein recovery and purification. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1984, vol. 34B, 190-198 [0065]
- **MAUBOIS, J.L.** Separation, extraction and fractionation of milk protein components. *Lait*, 1984, vol. 64, 485-495 [0065]
- **SANOGO, T. ; PÂQUET, D. ; AUBERT, F. ; LINDEN, G.** Purification of α s1-casein by Fast Protein Liquid Chromatography. *J. Dairy Sci.*, 1989, vol. 72, 2242-2246 [0065]
- **MERRIFIELD, R.B.** Solid phase peptide synthesis. I. Synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2154 [0065]
- **PELLOW, S. ; CHOPIN, P. ; FILE, S.E. ; BRILEY, M.** Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 1985, vol. 14, 149-167 [0065]
- **BOURIN, M. ; HASCOËT, M.** The mouse light/dark box test. *Eur. J. Pharmacol.*, 2003, vol. 463, 55-65 [0065]
- **GUESDON et al.** A tryptic hydrolysate from bovine milk α s1-casein improves sleep in rats subjected to chronic mild stress, 2006, vol. 27 (6), 1476-1482 [0065]