

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 436**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00	(2006.01)
A61K 38/10	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)
A61K 36/48	(2006.01)
C07K 14/415	(2006.01)
A23L 33/18	(2006.01)
A61K 38/08	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2013 PCT/EP2013/053233**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14127798**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2013 E 13704797 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2958578**

54 Título: **Péptidos funcionales para trastornos de obesidad**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2018

73 Titular/es:

**DANONE, S.A. (100.0%)
Buenos Aires 21
08029 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**MONTSERRAT CARRERAS, AGUSTI;
ALVAREZ FERNÁNDEZ, CRISTINA;
ANDREU COROMINAS, MONTSERRAT;
RAMÓN VIDAL, DANIEL;
BATALLER LEIVA, ESTHER;
MARTORELL GUÉROLA, PATRICIA y
GENOVÉS MARTÍNEZ, SALVADOR**

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 676 436 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).

Péptidos funcionales para trastornos de obesidad

DESCRIPCIÓN

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un péptido que se puede obtener por hidrólisis de glicinina de soja mediante la acción de cultivos sobrenadantes de cepas que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* o *Streptococcus*.

10 El péptido, extractos que lo contienen y productos alimenticios que lo contienen son útiles para el tratamiento y/o la prevención de la obesidad y de la tensión oxidativa.

Técnica previa antecedente

15 La obesidad es una grave epidemia en nuestra sociedad moderna que conduce al desarrollo de múltiples patologías perjudiciales. Los trastornos relacionados con la obesidad pueden conducir a múltiples complicaciones a largo plazo tales como diabetes de tipo II, enfermedades cardiovasculares, varios tipos de cáncer y muchas otras enfermedades. Está claro que modificaciones en el comportamiento de la dieta y el gasto energético pueden provocar pérdida de peso o ser la causa de obesidad cuando la ingesta de energía excede el gasto de energía. Se ha prestado mucha atención al posible tratamiento farmacéutico contra la obesidad, especialmente los nuevos enfoques se basan en la búsqueda de compuestos funcionales capaces de inhibir la digestión de lípidos de la dieta (Shi Y, Burn P; 2004; Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity; Nat. Rev. Drug Discover. 3: 695-710).

25 En las últimas décadas, se han purificado y caracterizado una gran cantidad de enzimas implicadas en el metabolismo de lípidos. Las lipasas que digieren las grasas, tanto triacilglicerol como fosfolípidos, son de gran interés para la obesidad. Una de las lipasas más importantes es la lipasa pancreática (LP) que supone la hidrólisis del 50-70 % de las grasas de la dieta (Mukherjee M; 2003; Human digestive and metabolic lipases: a brief review; J. Mol. Catal. Enzym. B 22: 369-376). En la búsqueda de compuestos anti-obesidad, la inhibición de la LP ha sido uno de los mecanismos diana más ampliamente estudiados (Birari RB, Bhutani KK; 2007; Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential; Drug Discover. Today 12: 879-889). Hasta la fecha, el Orlistat, es el único fármaco aceptado en Europa que reduce la absorción de grasas mediante un mecanismo de acción periférico (Lunder M, Bratkovic, T, Kreft, S y Strukelj, B; 2005; Peptide inhibitor of pancreatic lipase selected by phage display using different elution strategies; Journal of Lipid Research 46: 1512-1516).

35 Además, existen pruebas considerables de estudios realizados en células y animales que sugieren la importancia de la fosfolipasa A2 pancreática (PLA2) en la digestión y absorción de lípidos. La familia de la fosfolipasa A2 (PLA2) cataliza la hidrólisis de fosfolípidos de membrana, liberando ácido araquidónico (AA), ácido docosahexaenóico (DHA), y otros ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Los PUFA liberados son precursores de una diversidad de eicosanoides, compuestos de 20 carbonos que incluyen prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y lipoxinas responsables de reacciones inflamatorias. Se ha demostrado que PLA2 y sus productos corriente abajo pueden actuar como mediadores biológicos importantes en el tejido adiposo, la activación de PLA2 por varias citoquinas sugiere que esta enzima funciona como enlace celular entre las vías inflamatorias y el metabolismo de lípidos constituyendo de ese modo una diana clave en la obesidad (Abbott M, Tang T mad Sul H; 2010; The role of phospholipase A2-derived mediators in obesity; Drug Discovery Today: Disease Mechanisms 7:3-4).

40 Por otro lado, la mayoría de los genes que codifican enzimas del metabolismo de lípidos se han clonado y secuenciado a partir de diferentes organismos, incluyendo seres humanos. Los estudios filogenéticos han revelado que el metabolismo de lípidos es una vía muy bien conservada de levaduras a seres humanos que abre una vía para el uso de organismos modelo en el estudio de fármacos anti-obesidad. En este sentido, el nematodo *Caenorhabditis elegans* es un organismo modelo perfecto para el estudio de la obesidad (Chiang SH, MacDougald OA; 2003; Will fatty worms help cure human obesity; Trends Genet. 19: 523-525). De hecho, el análisis en *C. elegans* de la inactivación génica de reducción de grasas usando ARN de interferencia, ha identificado 305 genes relacionados con grasa corporal reducida y 112 genes implicados en el almacenamiento aumentado de grasas, muchos de ellos con homólogos de mamífero (Ashrafi K *et al.*; 2003; Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes; Nature 421: 268-272). Además en *C. elegans*, las lipasas son factores clave en la obesidad. Recientes informes de grupos que trabajan sobre lipasas de *C. elegans* indican que en este organismo el metabolismo de las grasas es un vínculo inesperado entre la obesidad, la reproducción y el envejecimiento (Wang MC *et al.*; 2008; Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*; Science 232: 957-960; Xie T; 2008; Burn fat, live longer; Science 232: 865-866).

Se han estudiado compuestos naturales que impiden posiblemente el desarrollo de la obesidad y los trastornos metabólicos relacionados. Gargouri y colaboradores informaron de que algunas proteínas de soja tienen un efecto

inhibidor sobre la lipasa pancreática (Gragouri *et al*; 1984; Studies on the inhibition of pancreatic and microbial lipases by soybean proteins; J Lipid Res., 25:1214-1221). Estas moléculas no tienen un efecto directo en la enzima; modifican las emulsiones lipídicas, impidiendo el contacto entre la enzima y el sustrato. Del mismo modo, varios autores han explicado la presencia de proteínas básicas en algunas semillas con propiedades inhibitorias de actividad lipasa y posteriormente Miyazaki *et al*., en la patente US 5.411.956 describieron algunas proteínas usadas como inhibidores de lipasa en el tratamiento de la obesidad (Wang y Huang; 1984; Inhibitors of lipase activities in soybean and other oil seeds; Plant Physiol., 76:929-934; Tani *et al* ; 1994; Purification and characterization of proteinous inhibitor of lipase from wheat flour ; J Agri Food Chem., 42:2382-2385; Tsujita *et al*; 1996; Studies of the inhibition of pancreatic and carboxylester lipases by protamine; J Lipid Res., 37:1481-1487; Gragouri *et al*; 1984; Inhibition of pancreatic and microbial lipases by proteins; Biochim. Biophys. Acta., 795:326-331).

Del mismo modo, estos y otros autores demostraron que la absorción intestinal de lípidos se reducía por sustancias fenólicas (es decir, ácido clorogénico, (+) catequina, epicatequina, floridzina, rutina y procianidinas (taninos condensados)) causando un efecto inhibidor *in vitro* sobre las lipasas digestivas (Wang *et al*; 2006; Green tea catechins inhibit pancreatic phospholipase A2 and intestinal absorption of lipids in ovariectomized rats; J Nutr Bioch., 17:492-498), Juhel *et al* (Juhel *et al*; 2000; Green tea extract (AR25) inhibits lipolysis of triglycerides in gastric and duodenal medium in vitro; J Nutr.Biochem., 11:45-51), Sugiyama *et al* (Sugiyama *et al*; 2007; Oligomeric Procyanidins in Apple Polyphenol Are Main Active Components for Inhibition of Pancreatic Lipase and Triglyceride Absorption; J Agric Food Chem., 55:4604-4609) y Rahul *et al* (Rahul *et al*; 2007; Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential "Drug Discovery" today., 12:19-20).

Sin embargo, el estudio de péptidos funcionales relacionados con obesidad, obtenidos de forma química, biotecnológica o mediante tratamiento enzimático de proteínas, sigue siendo un área por explorar, aunque está provocando cada vez más interés. La presente invención se centra en péptidos funcionales útiles en el tratamiento de la obesidad y tensión oxidativa obtenidos a partir de la digestión microbiana de glicinina usando cepas bacterianas acidolácticas.

Sumario de la invención

Por consiguiente en un primer aspecto, la invención se refiere a péptidos con actividades inhibitorias de LP (lipasa pancreática) y/o PLA2 (fosfolipasa pancreática) que se pueden obtener por hidrólisis de glicinina de soja con *Streptococcus thermophilus* CNCM 1-2776 para su uso en el tratamiento o prevención de obesidad y/o tensión oxidativa, que consiste en SEQ ID NO. 4: SVIKPPTD. En un aspecto preferido, el péptido que consiste en SEQ ID NO. 4, bien en forma aislada y/o bien en forma de un extracto, puede usarse para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno de obesidad así como contra una tensión oxidativa.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un producto alimenticio que comprende los péptidos con actividades inhibitorias de LP (lipasa pancreática) y/o PLA2 (fosfolipasa pancreática), que consisten en: SEQ ID NO 4, o un extracto que comprende el péptido útil mencionado para el tratamiento y/o prevención de la obesidad y la tensión oxidativa.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende los péptidos con actividades inhibitorias de LP (lipasa pancreática) y/o PLA2 (fosfolipasa pancreática), que consisten en: SEQ ID NO. 4: SVIKPPTD, o un extracto que comprende el péptido útil mencionado para el tratamiento y/o prevención de la obesidad y la tensión oxidativa.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de determinadas bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus*, en particular, *Streptococcus thermophilus* CNCM 1-2776, *Streptococcus thermophilus* CNCM I-1630 y/o *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4270, sobrenadantes o células que contienen las proteasas de dichas cepas para obtener el péptido y/o extractos que contienen el péptido con actividades inhibitorias de LP (lipasa pancreática) y/o PLA2 (fosfolipasa pancreática), que consisten en: SEQ ID NO. 4: SVIKPPTD.

Figuras

La Figura 1 representa el efecto de la reducción de la grasa corporal de *C. elegans* de extractos peptídicos obtenidos de glicinina de soja y seleccionados a partir de ensayo de inhibición de PLA2.
La Figura 2 representa el efecto de protección contra una tensión oxidativa aguda por diferentes extractos peptídicos en *C. elegans*.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un péptido de glicinina obtenido por hidrólisis con diferentes cepas bacterianas acidolácticas para su uso en el tratamiento y/o prevención del trastorno de obesidad y tensión oxidativa. El péptidos

es capaz de inhibir *in vitro* enzimas lipolíticas (LP y PLA2) y reducir la acumulación de grasa y proteger contra la tensión oxidativa aguda en un modelo *in vivo* usando *Caenorhabditis elegans*.

5 Se realizaron estudios *in vitro* para seleccionar varias cepas de bacterias acidolácticas capaces de liberar péptidos a partir de glicinina de soja capaces de inhibir actividades enzimáticas de importancia en trastornos de obesidad. Los extractos peptídicos se obtuvieron después de 72 h de hidrólisis de glicinina de soja por cultivos sobrenadantes de diez cepas diferentes pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* o *Streptococcus*. Los extractos generados se exploraron con respecto a su capacidad de inhibir *in vitro* las enzimas LP y PLA2. Finalmente, los extractos peptídicos seleccionados se exploraron después con respecto a su capacidad de reducir la acumulación de grasa usando un modelo *in vivo* de *Caenorhabditis elegans*, y posteriormente los extractos peptídicos seleccionados también se ensayaron con respecto a su capacidad de proteger contra una tensión oxidativa aguda usando el mismo sistema animal.

15 Como resultado de este estudio, se descubrió que un extracto peptídico obtenido después de hidrólisis de glicinina con proteasas de sobrenadante de algunas cepas era capaz de inhibir *in vitro* la LP y la PLA2, y de reducir la acumulación de grasa y proteger contra la tensión oxidativa usando el modelo *in vivo* de *C. elegans*. El péptido antioxidante responsable de la inhibición *in vitro* de la LP y la PLA2 y de la reducción de grasa *in vivo* se identificó después.

20 El consumo de estos extractos peptídicos específicos puede usarse ventajosamente en personas que padecen obesidad o en personas en riesgo de padecer obesidad, tales como personas con un historial familiar de obesidad o personas con problemas en el metabolismo de lípidos.

Selección de cepas

25 Con el fin de seleccionar la bacteria acidoláctica más eficaz que tuviese actividad proteasa contra glicinina, diferentes cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* se sometieron al siguiente ensayo de hidrólisis.

30 El sustrato seleccionado para realizar el proceso de hidrólisis fue glicinina de soja. La glicinina es la proteína principal de soja extraída de harina de soja después de tratamiento con mercaptoetanol seguido por dos etapas de centrifugación como se describe en Thanh V.H. *et al.* (Major proteins of soybean seeds: a straightforward fractionation and their characterization. 1976. J Agric Food Chem 24: 1117-1121). Entre las fuentes enzimáticas usadas para degradar glicinina, se ensayaron diez cepas: 6 cepas de géneros *Streptococcus* (cepas 2, 3, 4, 5, 6, 7) y 4 cepas de géneros *Lactobacillus* (cepas 8, 9, 10 y 11). Todas estas cepas se cultivaron en medio óptimo (MRS para cepas de *Lactobacillus* y BHI para cepas de *Streptococcus*) durante 17 h a 37 °C y las proteasas con un peso molecular por encima de 10 KDa tanto en sobrenadante como en células se concentraron para usarse como fuentes enzimáticas en ensayos de hidrólisis de glicinina. Por un lado, se obtuvieron proteasas del sobrenadante después de centrifugación durante 15 minutos a 4000 rpm. Después el sobrenadante se ultrafiltró por 10 KDa y se resuspendió la parte superior en 2 ml con tampón de citrato fosfato 50 mM pH 7. Por otro lado, las células obtenidas de los diferentes cultivos se lavaron con solución salina durante 15 minutos a 4000 rpm y se resuspendieron en tampón de citrato fosfato 50 mM pH 7 para evaluar la actividad proteasa en células y sobrenadante (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad proteasa de diferentes cepas LAB de colección de cultivos.

Cepas	Microorganismos	Actividad proteasa (U.I./ml)	
		Sobrenadante	Célula
2	<i>Streptococcus thermophilus</i> CNCM I-2965	0,005	0,003
3	<i>Streptococcus thermophilus</i> CNCM I-2785	0,009	0,001
4	<i>Streptococcus thermophilus</i> CNCM I-4269	0,001	0,002
5	<i>Streptococcus thermophilus</i> CNCM 1-3211	0,003	0,001
6	<i>Streptococcus thermophilus</i> CNCM I-2776	0,006	0,001
7	<i>Streptococcus thermophilus</i> CNCM 1-1630	0,003	0,001
8	<i>Lactobacillus delbrueckii lactis</i> CNCM I-4280	0,028	0,009
9	<i>Lactobacillus helveticus</i> CNCM I-4279	0,010	0,012
10	<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i> CNCM I-4270	0,016	0,005
11	<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i> CNCM 1-1518	0,029	0,006

45 A partir de lo anterior se observó que se encontraba que el sobrenadante de cultivo de cepas bacterianas acidolácticas era más eficaz para proporcionar la mayor actividad proteasa y por lo tanto producir péptidos funcionales en obesidad.

Obtención de extractos peptídicos

50

Se realizó hidrólisis enzimática durante 72 h a 37 °C con 13,5 ml de 1 % de glicinina en tampón de citrato fosfato 50 mM pH 7 y 1,5 ml de cada sobrenadante de cultivo concentrado a 10 KDa en estudio. La reacción se detuvo por ultrafiltración con filtros de 3 KDa y las fracciones inferiores, que contenían péptidos liberados después de hidrólisis se evaluaron *in vitro* para ensayar su capacidad de inhibir enzimas lipolíticas como la LP y PLA2 y estudiar su capacidad *in vivo* para reducir la acumulación de grasa en un modelo de *C.elegans*.

Exploración de extractos peptídicos con respecto a su capacidad de inhibir la actividad enzimática de la LP y PLA2 *in vitro*

La inhibición de la LP se determinó usando como sustrato oleato de 4-metil umbeliferilo (4MUO) como describen Sugiyama *et al.* (Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. J Agric Food Chem (2007); 55: 4604-4609) con algunas modificaciones. Se incubaron alícuotas de 25 µl de cada extracto peptídico con 25 µl de solución de LP (1 mg/ml) y se preincubaron durante 10 minutos a 26 °C con agitación de 500 rpm. La reacción se inició añadiendo 50 µl de 4MUO (0,1 mM) disuelto en tampón de Dulbecco. Después de incubación a 26 °C durante 20 minutos con agitación constante (500 rpm), la reacción se detuvo añadiendo 100 µl de tampón de citrato sódico 0,1 M (pH 4,2). La cantidad de 4-metil umbeliferona liberada por la enzima se determinó por fluorescencia. Se usaron extractos peptídicos como inhibidores en el ensayo enzimático pero tuvieron que diluirse 1/20 o 1/50 a causa de la interferencia entre la fluorescencia y el tampón que contenía los péptidos.

La inhibición de la enzima PLA2 se determinó por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) usando 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC) como sustrato como se describe por Singh *et al.* (A rapid isocratic high-performance liquid chromatography method for determination of cholesterol and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. Journal of Chromatography (2005); 1073:347-353). Se usó HPLC Waters 2695 con una serie de detectores de fotodiodos Waters 2996 y una columna C8 Hypersil BDS (250 x 4,6 mm, 5 µm) para realizar un método isocrático de eluyente formado por una mezcla de tampón de fosfato amónico 50 mM pH 2,7:metanol (15:85, v/v). La Tabla 2 contiene los valores de inhibición de la LP por los extractos peptídicos obtenidos a partir de glicinina de soja. La Tabla 3 contiene los valores de inhibición de la PLA2 por los extractos peptídicos obtenidos a partir de glicinina de soja.

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de LP por extractos peptídicos de glicinina de soja con sobrenadantes y células de las cepas analizadas.

% de inhibición de LP – Extractos peptídicos de glicinina D(1/20)		
Control de glicinina 72 h	2,4 ± 4,6	
Cepas	Sobrenadantes	Células
2 - <i>St. thermophilus</i>	3,0 ± 4,5	2,0 ± 4,9
3 - <i>St. thermophilus</i>	4,5 ± 5,6	1,5 ± 5,4
4 - <i>St. thermophilus</i>	0,7 ± 3,3	1,6 ± 4,0
5 - <i>St. thermophilus</i>	2,4 ± 5,0	1,1 ± 2,4
6 - <i>St. thermophilus</i>	0,9 ± 3,9	3,7 ± 3,2
7 - <i>St. thermophilus</i>	2,0 ± 5,6	5,7 ± 1,9
8 - <i>L. helveticus</i>	1,3 ± 2,7	4,3 ± 3,4
9 - <i>L. acidophilus</i>	3,4 ± 3,3	2,1 ± 3,5
10 - <i>L. paracasei</i> subespecie <i>paracasei</i>	2,6 ± 3,3	3,3 ± 3,1
11 - <i>L. paracasei</i> subespecie <i>paracasei</i>	3,1 ± 5,3	4,5 ± 6,2

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de PLA2 por extractos peptídicos de glicinina de soja con sobrenadantes y células de las cepas analizadas.

% de inhibición de PLA2 - Extractos peptídicos de glicinina		
Control de glicinina 72 h	9,5 ± 7,4	
Cepas	Sobrenadantes	Células
2 - <i>St. thermophilus</i>	6,4 ± 3,2	7,4 ± 1,9
3 - <i>St. thermophilus</i>	2,8 ± 0,7	19,2 ± 1,3
4 - <i>St. thermophilus</i>	4,9 ± 0,3	8,6 ± 2,4
5 - <i>St. thermophilus</i>	5,3 ± 1,7	11,0 ± 2,9
6 - <i>St. thermophilus</i>	17,1 ± 2,3	13,0 ± 3,9
7 - <i>St. thermophilus</i>	21,5 ± 1,7	6,7 ± 4,0
8 - <i>L. helveticus</i>	7,9 ± 0,5	3,5 ± 1,1
9 - <i>L. acidophilus</i>	9,0 ± 2,6	5,7 ± 3,2
10 - <i>L. paracasei</i> subespecie <i>paracasei</i>	20,9 ± 1,6	7,8 ± 1,0
11 - <i>L. paracasei</i> subespecie <i>paracasei</i>	14,0 ± 3,0	3,5 ± 0,9

Se seleccionaron los mejores extractos peptídicos inhibidores de glicinina de soja para ensayarse *in vivo* con modelo de *C. elegans*. Estos extractos peptídicos y sus códigos asignados se resumen en la Tabla 4.

5 **Tabla 4.** Grupo de los extractos péptidos seleccionados para análisis *in vivo*

Muestras seleccionadas del ensayo de inhibición de PLA2	Código de muestra	% de inhibición de PLA2
<i>St. thermophilus</i> 3 células glicinina 72 h	M20G	19,2 ± 1,3
<i>St. thermophilus</i> 6 sobrenadante glicinina 72 h	M5G	17,1 ± 2,3
<i>St. thermophilus</i> 7 sobrenadante glicinina 72 h	M31G	21,5 ± 1,7
<i>L. paracasei</i> subespecie <i>paracasei</i> 10 sobrenadante glicinina 72 h	M27G	20,9 ± 1,6
<i>L. paracasei</i> subespecie <i>paracasei</i> 11 sobrenadante glicinina 72 h	M29G	14 ± 3

Exploración de extractos peptídicos para su capacidad de reducir *in vivo* la acumulación de grasa

10 Se analizó la capacidad de reducir el contenido de grasa corporal en el nematodo *C. elegans* en un grupo de 5 extractos peptídicos previamente obtenidos de glicinina (véase Tabla 4). Estas muestras se seleccionaron por su alto efecto sobre la inhibición *in vitro* de la LP y PLA2. Específicamente, se seleccionaron 5 extractos peptídicos del ensayo de inhibición de PLA2 (M20G, M5G, M31G, M27G y M29G). Se analizó el contenido de grasa corporal en la cepa de tipo silvestre de *C. elegans* N2 por tinción con Rojo Nilo de nematodos vivos. Los experimentos se
15 realizaron con poblaciones de edad sincronizada, empezando en la fase de huevo hasta la fase de adulto joven (adultos de 3 días). Durante los experimentos, los gusanos se cultivaron en las placas de agar NGM como condición de control, NGM con los correspondientes extractos peptídicos (100 µl/placa) y NGM con 6 µl/ml de Orlistat como control positivo. Se añadió Rojo Nilo en la parte superior de las placas NG ya sembradas con la cepa de *Escherichia coli* OP50 a una concentración final de 0,05 µg/ml. Después de incubación a 20 °C, los gusanos adultos jóvenes (60
20 gusanos por condición) se recogieron para medir la fluorescencia *in vivo* en un sistema de fluorímetro VersaFluorTM. La fluorescencia obtenida en los gusanos tratados se calculó a partir de la fluorescencia de gusanos alimentados en condiciones de control (muestra de referencia). Los experimentos se realizaron por duplicado.

25 Los resultados globales obtenidos en la evaluación de los 5 extractos peptídicos mostraron un mayor efecto sobre la reducción de grasa corporal en el caso de aquellos con capacidad inhibidora de PLA2 (Tabla 5 y Figura 1).

30 Los extractos peptídicos seleccionados a partir de su efecto inhibidor de PLA2 fueron, en general, más eficaces sobre la reducción de lípidos en *C. elegans* (Tabla 5). El porcentaje de reducción de fluorescencia, como se muestra en la Figura 1, fue del 16,2 al 37,7 %. Es importante resaltar el efecto de M5G, M27G y M31G con el 37,7 %, 31,6 % y 28,6 % de reducción de fluorescencia respectivamente.

35 Para resumir, se ha descubierto que un grupo de extractos peptídicos con un efecto inhibidor *in vitro* significativo sobre PLA2 tiene también un importante efecto *in vivo* sobre la reducción de grasa corporal.

Tabla 5. Porcentaje de reducción de grasa corporal de *C. elegans* producida por extractos peptídicos seleccionados a partir del ensayo previo de inhibición enzimática.

Muestras seleccionadas del ensayo de inhibición de PLA2	Código de muestra	% de reducción de grasa (<i>C. elegans</i>)
<i>St. thermophilus</i> 3 células glicinina 72 h	M20G	16,05
<i>St. thermophilus</i> 6 sobrenadante glicinina 72 h	M5G	37,71
<i>St. thermophilus</i> 7 sobrenadante glicinina 72 h	M31G	28,57
<i>L. paracasei</i> subespecie <i>paracasei</i> 10 sobrenadante glicinina 72 h	M27G	31,61
<i>L. paracasei</i> subespecie <i>paracasei</i> 11 sobrenadante glicinina 72 h	M29G	16,29

Exploración de extractos peptídicos con respecto a su capacidad de proteger contra tensión oxidativa aguda

40 Se analizó la protección de los 5 extractos peptídicos seleccionados contra una tensión oxidativa aguda en el modelo *in vivo* de *C. elegans*.

45 Los experimentos se realizaron con poblaciones de edad sincronizada de la cepa de tipo silvestre de *C. elegans* N2. Los nematodos se alimentaron desde la fase de huevo hasta la fase adulta de 5 días con los diferentes extractos peptídicos (100 µl/placa). Se incluyó una condición de alimentación de control (NGM) y un control positivo (vitamina C, 0,1 µg/ml). Después de incubación a 20 °C, los gusanos se sometieron a una tensión oxidativa transfiriéndolos a nuevas placas con H₂O₂ (2 mM). La viabilidad de la población de gusanos se determinó después de 5 h de incubación en cada condición de cultivo. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Los 5 extractos peptídicos seleccionados se analizaron en dos ensayos diferentes. El primero (véase la Figura 2)

incluyó las muestras que producían la mayor inhibición *in vitro* de PLA2 (reducen la grasa corporal *in vivo* entre el 28,6 y el 39,1 %). Las muestras M5G, M31G, M27G se obtuvieron de sustratos de glicinina y todas ellas mostraron una alta protección contra tensión oxidativa en el nematodo. Se observaron altos porcentajes de supervivencia después de tensión oxidativa (entre el 53 y el 64 %) en comparación con condiciones de control (39,5 %). Los resultados muestran alta protección contra tensión oxidativa y capacidad de reducir el contenido de grasa en el nematodo para los extractos peptídicos M5G, M31G y M27G (Figura 2).

En resumen, un grupo de 3 extractos peptídicos, M5G, M31G, M27G, obtenidos de glicinina por hidrólisis con las cepas *St. thermophilus* 6, *L. paracasei* subespecie *paracasei* 10 y *St. thermophilus* 7, tienen un alto efecto sobre la reducción de grasa y una protección significativa contra la tensión oxidativa en el modelo *in vivo* de *C. elegans*, lo que demuestra su efecto beneficioso sobre ambas funcionalidades (Tabla 6).

Tabla 6. Protección contra la tensión oxidativa de extractos peptídicos seleccionados del ensayo de PLA2.

Muestras seleccionadas del ensayo de PLA2	Código de muestra	% de reducción de grasa (<i>C. elegans</i>)	% de supervivencia (<i>C. elegans</i>)
<i>St. thermophilus</i> 6 sobrenadante glicinina 72 h	M5G	37,71	56
<i>St. thermophilus</i> 7 sobrenadante glicinina 72 h	M31G	28,57	53
<i>L. paracasei</i> subespecie <i>paracasei</i> 10 sobrenadante glicinina 72 h	M27G	31,61	55,5

Las siguientes cepas después se seleccionaron preferentemente para el propósito de la presente invención.

Cepa 6: *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2776

Cepa 7: *Streptococcus thermophilus* CNCM I-1630

Cepa 10: *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei* CNCM I-4270

La presente invención también abarca el uso de las cepas mencionadas anteriormente, pero también cepas mutantes o cepas transformadas genéticamente derivadas de una cualquiera de las cepas precursoras que aún tienen actividad proteasa contra glicinina y que producen el péptido funcional de la presente invención. Estas cepas mutantes o transformadas genéticamente pueden ser cepas donde uno o más genes endógenos de la cepa precursora se han mutado, por ejemplo para modificar algunas de sus propiedades metabólicas. También pueden ser cepas resultantes de la transformación genética de la cepa precursora por uno o más genes de interés, por ejemplo para dar a dichas cepas características fisiológicas adicionales.

Identificación de péptidos funcionales con capacidad de inhibir *in vitro* PLA2, reducir la grasa y proteger contra la tensión oxidativa en el modelo de *C. elegans*

Los 3 extractos peptídicos capaces de inhibir *in vitro* PLA2, reducir la grasa y proteger contra la tensión oxidativa *in vivo* se seleccionaron para identificar la secuencia peptídica funcional presente en ellos. La identificación de péptidos funcionales se realizó con las muestras M5G, M27G y M31G y se obtuvo por nESI-MS/MS.

La Tabla 7 contiene las secuencias peptídicas identificadas a partir de glicinina y la cantidad de veces que aparece en cada muestra evaluada. Todos los péptidos mostrados en la Tabla 7 estuvieron presentes solamente en muestras tratadas con las cepas *St. thermophilus* 6 y 7 y *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei* 10, y no se identifican en las muestras de control sin tratamiento hidrolítico.

Tabla 7. Frecuencia de secuencias peptídicas de glicinina de soja identificadas en las muestras M5G, M27G y M31G.

Secuencia	Peso molecular	M5G	M27G	M31G
V.AVSLIDTN.S	831,53	1		
Y.LAGNQEQEFLK.Y	1276,07	2		
Y.LAGNQEQEFLQ.Y	1276,07	1		
L.AGNQEQEFLK.Y	1162,99	2		2
L.AGNQEQEFLQ.Y	1162,99	1		
Q.GENEGEDKGAIVT.V	1317,85	1		
Q.GENEEEDSGAIVTKGG.L	1690,05	1		
N.EGEDKGAIVTVKG.G	1301,91	1		
N.EGEDKGAIVTVKGG.L	1358,95	1		
N.EEEDSGAIVTVKGG.L	1389,95	1		
E.EEDSGAIVTVKGG.L	1260,95	1		
E.EDSGAIVTVKGG.L	1131,89	1		
V.TAPAMRKPQQEEDDDDEEQP.Q	2456,41	1		

Secuencia	Peso molecular	M5G	M27G	M31G
V.TAPAMRKPQQEEDDDDEEQPQ.C	2585,41	1		1
E.EEEKGAIIVTK.G	1201,93	1		
T.FEEPQQPQ.Q	1001,89	1		
T.FEEPQQPQQRGQ.S	1470,95	1		1
N.ALEPDHRVES.E	1151,93	1		
R.HFNEGDVL.V	928,7	1		
E.EEEEKGSVLSGFSK.H	1452,97	1		
R.EQDEDEDEDEDKPRPSRPSQGK.R	2585,41	1	1	1
E.QDEDEDEDEDKPRPSRPSQGK.R	2456,41	1		
E.QDEDEDEDEDKPRPSRPSQGK.R.N	2612,53	1		
D.EDEDEDEDEDKPRPSRPSQG.K	2084,41	1		
D.EDEDEDEDEDKPRPSRPSQGK.R	2213,44	1		
D.EDEDEDEDEDKPRPSRPSQGK.R.N	2369,53	1		
E.EDSGAIIVTK.G	1017,91		1	
V.FDGEL.Q	579,44		3	
E.GGLIQTW.N	774,02		1	
D.EDDEDEQIPS.H	1175,77		1	
E.DEQIPSHPPRRP.S	1428,37		1	
K.REQDEDEDEDEDKPRPSRP.S	2341,48		2	
K.REQDEDEDEDEDKPRPSRPS.Q	2428,57		2	
K.REQDEDEDEDEDKPRPSRPSQGK.R	2741,53		2	1
R.EQDEDEDEDEDKPRPSRP.S	2185,42		1	
R.EQDEDEDEDEDKPRPSRPS.Q	2272,48		1	
R.EQDEDEDEDEDKPRPSRPSQG.K	2457,49		1	
E.DEDEDEDEDKPRPSRPSQGK.R	2084,5		1	
K.HEDDEDEDEEEDQPRPDHPPQRP.S	2810,5		1	
K.HEDDEDEDEEEDQPRPDHPPQRP.S.R	2897,56		1	
E.DDEDEEEDQPRPDHPPQRP.S	2544,58		1	
E.DEDEEEDQPRPDHPPQRP.S	2185,42		1	
E.DEDEEEDQPRPDHPPQRP.S.R	2272,42		1	
D.EDEEEDQPRPDHPPQRP.S	2070,46		1	
D.EEEDQPRPDHPPQRP.S	1826,11		3	
D.EEEDQPRPDHPPQRP.S.R	1913,29		1	
E.EEDQPRPDHPPQRP.S	1697,2		1	
E.DQPRPDHPPQRP.S	1439,01		3	
T.FEEPQQPQR.G	1284,97			1
G.DLIAVP.T	626,51			2
K.HQQEEENEGGSIL.S	1469,11			1
K.NLQGENEGEDKGAIIVTK.V	1673,19			1
K.NLQGENEGEDKGAIIVTK.G	1900,41			2
K.GKQEEENEGSNIL.S	1573,15			1
K.GKQEEENEGSNILS.G	1661,13			1
L.QGENEEEDSGAIIVTK.G	1704,17			1
K.REQDEDEDED.E	1278,53			1
K.REQDEDEDEDEDKPRPSRPSQ.G	2556,64			1
K.REQDEDEDEDEDKPRPSRPSQG.K	2613,61			1
K.REQDEDEDEDEDKPRPSRPSQGK.R.N	2898,01			1

5 Los hidrolizados M5G y M27G de las cepas *St. thermophilus* 6 y *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei* 10 se eligieron y purificaron adicionalmente por cromatografía en fase inversa para identificar los péptidos responsables de la reducción de grasa *in vivo*. Se ensayaron fracciones de cromatografía en fase inversa hacia *C. elegans* para estudiar la reducción de grasa e identificar los péptidos presentes en las positivas de las cepas *St. thermophilus* 6 y *L. paracasei* subespecie *paracasei* 10. (Tabla 8).

Tabla 8. Secuencias peptídicas de glicinina de soja identificadas en fracciones purificadas de las cepas *St. thermophilus* 6 (M5G) y *L. paracasei* subespecie *paracasei* 10 (M27G).

SEQ ID NO.	Secuencia peptídica	Peso Molecular (Da)	Fracción 6 cepa 6	Fracción 7 cepa 6	Fracción 6 cepa 10	Proteína
7	QDEDEDEDEDKPRPSRP	2055,88	4		4	Glicinina G4
8	DEDEDEDEDKPRPSRP	1927,99	1			

SEQ ID NO.	Secuencia peptidica	Peso Molecular (Da)	Fracción 6	Fracción 7	Fracción 6	Proteína
9	DEDEDEDKPRPSRP	1683,73	4		8	
10	DEDEDKPRPSRPSQG	1711,87	1			
1	EEEGGSVLSG	1091,73			1	
11	GKREQDEDEDEDEDKPRPSRP	2525,89			8	
12	HQQEEENEGGSILSG	1612,89		1		Glicinina G1
6	QGENEGEDKGAIVT	1445,89		1		
13	QGENEGEDKGAIVTK	1672,91		1		
4	SVIKPPTD	855,46		1		
14	SVIKPPTDE	984,52		1		
15	IKPPTDE	798,49		1		
2	SDNFEY	773,75		2		
5	QGENEEEDSGAIVTK	1703,99		2		Glicinina G2
16	NEGDVLV	744,54		2		Glicinina G5
17	YNTGDEPWA	1063,52		1		
18	HGKHEDDEDEEEDQPRPDHPPQRP	3132,55		1		
19	GKHEDDEDEEEDQPRPDHPPQRP	2995,3		1		
20	DDEDEDEEEDQPRPDHPPQRP	2810,68		1		
21	HEDDEDEEEDQPRPDHPPQRI	2544,13		2		
3	EEDQPRPDHPPQRP	1696,83		1		
22	SGPLVNP	682,58		1		

A partir de estas fracciones purificadas, se seleccionó un total de 11 péptidos para sintetizarse y evaluarse *in vivo* en el modelo de obesidad de *C. elegans* (Tabla 9). Todos los péptidos se evaluaron a 1 µg/ml de concentración final.

5 **Tabla 9.** Péptidos de glicinina seleccionados para su evaluación *in vivo* con *C. elegans*.

SEQ ID NO.	Código de péptido	Secuencia	Fuente	% de reducción de fluorescencia <i>C. elegans</i>
4	P8a	SVIKPPTD	Cepa 6	44,67 ± 10,5
2	P6a	SDNFEY	Cepa 6	40,90 ± 11,6
3	P14c	EEDQPRPDHPPQRP	Cepa 6	39,37 ± 7,08
5	P16f	QGENEEEDSGAIVTK	Cepa 6	38,95 ± 8,7
6	P14b	QGENEGEDKGAIVT	Cepa 6	35,30 ± 6,1
1	P10b	EEEGGSVLSG	Cepa 10	33,48 ± 6,1
11	P21b	GKREQDEDEDEDEDKPRPSRP	Cepa 10	24,91 ± 7,1
12	P15a	HQQEEENEGGSILSG	Cepa 6	22,82 ± 6,1
8	P16e	DEDEDEDEDKPRPSRP	Cepa 6	21,86 ± 4
7	P17c	QDEDEDEDEDKPRPSRP	Cepa 10	18,13 ± 5,57
9	P14d	DEDEDEDKPRPSRP	Cepa 6	6,26 ± 7,6

Entre ellos, los péptidos con capacidad de reducir la acumulación de grasa en más del 30 % se evaluaron *in vitro* hacia lipasa pancreática (LP) y fosfolipasa A2 (PLA2). En el caso de LP, se determinó el valor de CI50 (Tabla 10) y en el estudio de PLA2 se ensayaron tres concentraciones diferentes de cada péptido (Tabla 11).

10 **Tabla 10.** Valor de CI50 de cada péptido en el ensayo enzimático de LP.

SEQ ID NO.	Código de péptido	Secuencia peptidica	CI50 de LP (mg/ml)	Fuente
1	P10b	EEEGGSVLSG	0,035	Cepa 10, glicinina
2	P6a	SDNFEY	0,043	Cepa 6, glicinina
3	P14c	EEDQPRPDHPPQRP	0,049	Cepa 6, glicinina
4	P8a	SVIKPPTD	0,059	Cepa 6, glicinina
5	P16f	QGENEEEDSGAIVTK	0,447	Cepa 6, glicinina

SEQ ID NO.	Código de péptido	Secuencia peptídica	CI50 de LP (mg/ml)	Fuente
6	P14b	QGENEGEDKGAIVT	0,5	Cepa 6, glicinina

Tabla 11. Porcentaje de inhibición de PLA2 de cada péptido a tres concentraciones diferentes ensayadas.

Concentración (mg/ml)	(P6a) SEQ ID NO. 2	(P8a) SEQ ID NO. 4	(P10b) SEQ ID NO. 1	(P14b) SEQ ID NO. 6	(P14c) SEQ ID NO. 3	(P16f) SEQ ID NO. 5
0,035	10,6 ± 5,0	12,7 ± 6,1	7,8 ± 5,6	5,9 ± 5,0	20,4 ± 4,4	13,6 ± 3,8
0,35	12,1 ± 4,0	12,9 ± 3,9	13,9 ± 3,3	22,2 ± 5,6	21,1 ± 4,3	13,6 ± 0,4
2	24,5 ± 1,4	26,0 ± 6,4	26,1 ± 5,9	23,8 ± 5,5	25,2 ± 4,3	15,9 ± 6,0
3,5	31,9 ± 5,5	20,1 ± 7,7	26,9 ± 2,5	28,8 ± 3,1	26,1 ± 4,1	22,5 ± 3,7

Identificación de los péptidos más resistentes potencialmente responsables de la reducción de grasa

5 Se desarrolló un modelo de digestión enzimática *in vitro* de un tracto digestivo *in vivo* para imitar las condiciones fisiológicas para comprobar y certificar que cada péptido seleccionado se degradaba de forma diferente a lo largo de todo el tracto gastrointestinal por el proceso digestivo. Se optimizaron las concentraciones de pepsina, pancreatina y bilis usando un diseño experimental publicado (Granado-Lorencio *et al* (2007). J.Agric. Food. Chem., 55, 6387-6394).

10 Mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), se observó que los péptidos P14c y P16f se degradaban completamente al inicio de la fase intestinal, mientras que P8a y P14b eran resistentes hasta el final del proceso donde finalmente se degradaban (Tabla 12).

15 **Tabla 12.** Porcentaje de degradación de los péptidos en el modelo de digestión *in vitro*.

	Degradación (%)				
	SEQ ID NO. 2 P6a	SEQ ID NO. 4 P8a	SEQ ID NO. 6 P14b	SEQ ID NO. 3 P14c	SEQ ID NO. 5 P16f
Fase oral 5 min.	23,7	1,7	6,0	5,3	-1,2
Fase gástrica 30 min.	31,0	-1,3	6,7	4,2	65,8
Fase gástrica 120 min.	66,9	-1,0	8,7	4,6	95,2
Fase intestinal 15 min.	100	51,2	36,7	92,9	100,0
Fase intestinal 30 min.	100	71,6	48,9	93,2	100,0
Fase intestinal 60 min.	100	90,7	68,8	95,0	100,0
Fase intestinal 120 min.	100	100,0	100,0	95,5	100,0

El péptido de la presente invención puede añadirse a una matriz alimenticia en forma aislada o en forma de un extracto. El péptido de la presente invención puede añadirse a la matriz alimenticia solo o en forma de mezclas.

20 En una realización preferida, el péptido puede obtenerse o fabricarse por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo síntesis de los péptidos puros y (aislados de) fracciones proteicas generadas por hidrólisis o fermentación como se describe en la presente memoria descriptiva.

25 El péptido de la invención puede estar presente en el producto alimenticio como péptidos tal cual (por ejemplo, a partir de la síntesis de los péptidos puros) o como parte de una fracción proteica (por ejemplo, proteína hidrolizada o fermentada).

30 En una realización particular de la presente invención, el péptido de la invención puede estar presente en un producto alimenticio como resultado de la adición de las cepas de la presente invención en las matrices alimenticias correspondientes que contienen glicinina de soja.

Preferentemente este producto alimenticio es un producto fermentado. El producto fermentado puede estar presente en forma de un líquido o presente en forma de un polvo seco obtenido por secado del líquido fermentado.

35 Preferentemente, el producto fermentado es un producto fresco y lácteo; más preferentemente leche fermentada y/o soja fermentada. Preferentemente, las composiciones nutricionales son leches pasteurizadas y esterilizadas, yogures y leches fermentadas, tales como:

40 Productos lácteos, tales como leche esterilizada y/o pasteurizada, yogures, leches fermentadas, postres basados en leche. Fórmulas infantiles y de continuación y alimentos para bebés. Queso fresco y/o pasteurizado. Productos vegetales, tales como, productos de zumo de fruta, jarabes y/o esencias de frutas, mermelada, compota y/o confitura. Leche y/o extractos de soja, chufas, cereales, nueces y frutos secos, extractos de leche y fermentados basados en soja, frutas, nueces y frutos secos y cereales. Fórmulas infantiles basadas en leche, productos lácteos,

5 frutas, cereales, arroz, alimentos para bebés, etc. Suplementos alimenticios frescos, secos y/o liofilizados distribuidos directamente o a través de productos alimenticios y preparaciones específicas para la población general o personas con problemas de peso u obesidad. Agua y bebidas enriquecidas y/o complementadas. En general, alimentos básicos y/o productos funcionales que son susceptibles de enriquecerse con péptidos funcionales derivados de la fermentación del producto básico, y/o extracción de péptidos funcionales, para añadir en matrices alimenticias como principios activos.

10 La cantidad del péptido de acuerdo con la invención en el producto alimenticio es preferentemente de al menos 0,01 g/kg, más preferentemente de 0,1 a 10 g/kg, incluso más preferentemente de 1 a 7 g/kg y mucho más preferentemente de 3 a 7 g/kg de dicho péptido, por ejemplo 5 g/kg. Preferentemente, la cantidad de péptido en estos productos alimenticios se elige de modo que la cantidad de péptido por cantidad total de ración del producto alimenticio sea de 0,01 a 1 g, preferentemente de 0,1 a 1 g, más preferentemente de 0,1 a 0,7 g y mucho más preferentemente de 0,2 a 0,5 g.

15 **Ejemplos**

1. Formulación de un producto alimenticio con los péptidos y el efecto de reducción de grasa

20 El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto anti-obesidad de los péptidos más eficaces obtenidos de glicinina después de su adición a una matriz alimenticia. Se seleccionaron 5 péptidos obtenidos de la hidrólisis de glicinina con la cepa 6 (P8a, P6a, P14c, P16f, P14b). Los péptidos de glicinina se añadieron a un producto fermentado de soja (Savia® de Danone) tanto solos como mezclados a concentración final de 1 µg/ml. Los nematodos se alimentaron con estos productos y después se cuantificaron los lípidos totales por tinción con Rojo Nilo.

25 La Tabla 13 muestra el nivel de reducción de fluorescencia en nematodos alimentados con producto fermentado de soja que contenía los diferentes péptidos de glicinina o su combinación. Los resultados indican la eficacia *in vivo* de todos los péptidos de glicinina cuando se añaden al producto fermentado de soja. La combinación de estos 5 péptidos en la matriz alimenticia también proporcionó una reducción significativa de la fluorescencia.

30 **Tabla 13.** Porcentajes de reducción de fluorescencia en nematodos alimentados con Savia® (Danone) que contenía los péptidos de glicinina seleccionados, P8a, P6a, P14c, P16f y P14b.

Condición	% de reducción de fluorescencia
NG-Orlistat	29,5 ± 0,1
NG-Savia	7,9 ± 2,9
NG-P8a	41,7 ± 4,02
NG-Savia+P8a	29,8 ± 3,3
NG-P6a	36,2 ± 4,1
NG-Savia+P6a	29,5 ± 2,5
NG-P14c	33,7 ± 5,5
NG-Savia+P14c	22,5 ± 1,5
NG-P16f	33,9 ± 5,7
NG-Savia+P16f	28,82 ± 6,6
NG-P14b	30,25 ± 4,2
NG-Savia+P14b	27,42 ± 4,07
NG-P8a+P6a+P14c+P16f+P14b	28,13 ± 1,5
NG-Savia+P8a+P6a+P14c+P16f+P14b	29,2 ± 1,4

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> DANONE, S.A.
- <120> PÉPTIDOS FUNCIONALES PARA TRASTORNOS DE OBESIDAD
- 40 <130> AX130013WO
- <160> 22
- <170> BiSSAP 1.2
- 45 <210> 1
- <211> 10

ES 2 676 436 T3

```

<212> PRT
<213> Glycine soja

<220>
5 <223> EEEGGSVLSG

<400> 1
      Glu Glu Glu Gly Gly Ser Val Leu Ser Gly
      1           5           10

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> Glycine soja

15 <220>
<223> SDNFEY

<400> 2
      Ser Asp Asn Phe Glu Tyr
      1           5

<210> 3
<211> 14
25 <212> PRT
<213> Glycine soja

<220>
<223> EEDQPRPDHPPQRP

30 <400> 3
      Glu Glu Asp Gln Pro Arg Pro Asp His Pro Pro Gln Arg Pro
      1           5           10

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Glycine soja

40 <220>
<223> SVIKPPTD

<400> 4
      Ser Val Ile Lys Pro Pro Thr Asp
      1           5

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
50 <213> Glycine soja

<220>
<223> QGENEEEDSGAIVTVK

55 <400> 5
      Gln Gly Glu Asn Glu Glu Glu Asp Ser Gly Ala Ile Val Thr Val Lys
      1           5           10           15

```

ES 2 676 436 T3

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Glycine soja*
 5
 <220>
 <223> QGENEGEDKGAIVT
 <400> 6
 10
 Gln Gly Glu Asn Glu Gly Glu Asp Lys Gly Ala Ile Val Thr
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Glycine soja*
 <220>
 <223> QDEDEDEDEDKPRPSRP
 20
 <400> 7
 Gln Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Lys Pro Arg Pro Ser Arg
 1 5 10 15
 Pro
 <210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Glycine soja*
 <220>
 <223> DEDEDEDEDKPRPSRP
 30
 <400> 8
 Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Lys Pro Arg Pro Ser Arg Pro
 1 5 10 15
 35
 <210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Glycine soja*
 40
 <220>
 <223> DEDEDEDKPRPSRP
 <400> 9
 45
 Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Lys Pro Arg Pro Ser Arg Pro
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Glycine soja*
 <220>
 <223> DEDEDKPRPSRPSQG
 55
 <400> 10
 Asp Glu Asp Glu Asp Lys Pro Arg Pro Ser Arg Pro Ser Gln Gly
 1 5 10 15

ES 2 676 436 T3

<210> 11
 <211> 21
 <212> PRT
 5 <213> *Glycine soja*

 <220>
 <223> GKREQDEDEDEDEDKPRPSRP

 10 <400> 11

 Gly Lys Arg Glu Gln Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Lys Pro
 1 5 10 15
 Arg Pro Ser Arg Pro
 20

 <210> 12
 15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Glycine soja*

 <220>
 20 <223> HQQEEENEGGSILSG

 <400> 12

 His Gln Gln Glu Glu Glu Asn Glu Gly Gly Ser Ile Leu Ser Gly
 1 5 10 15
 25
 <210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Glycine soja*
 30
 <220>
 <223> QGENEGEDKGAIPTVK

 <400> 13
 35
 Gln Gly Glu Asn Glu Gly Glu Asp Lys Gly Ala Ile Val Thr Val Lys
 1 5 10 15

 <210> 14
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> *Glycine soja*

 <220>
 <223> SVIKPPTDE
 45
 <400> 14

 Ser Val Ile Lys Pro Pro Thr Asp Glu
 1 5

 <210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Glycine soja*
 55
 <220>
 <223> IKPPTDE

ES 2 676 436 T3

<400> 15

Ile Lys Pro Pro Thr Asp Glu
1 5

5 <210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> *Glycine soja*

10 <220>
<223> NEGDVLV

<400> 16

Asn Glu Gly Asp Val Leu Val
1 5

15 <210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> *Glycine soja*

20 <220>
<223> YNTGDEPVVA

25 <400> 17

Tyr Asn Thr Gly Asp Glu Pro Val Val Ala
1 5 10

30 <210> 18
<211> 26
<212> PRT
<213> *Glycine soja*

35 <220>
<223> HGKHEDDEDEDEEEDQPRPDHPPQRP

<400> 18

His Gly Lys His Glu Asp Asp Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Gln
1 5 10 15
Pro Arg Pro Asp His Pro Pro Gln Arg Pro
20 25

40 <210> 19
<211> 25
<212> PRT
<213> *Glycine soja*

45 <220>
<223> GKHEDEDEDEEEDQPRPDHPPQRP

<400> 19

50 Gly Lys His Glu Asp Asp Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Gln Pro
1 5 10 15
Arg Pro Asp His Pro Pro Gln Arg Pro
20 25

<210> 20

ES 2 676 436 T3

<211> 21
<212> PRT
<213> *Glycine soja*

5 <220>
<223> DDEDEDEEEDQPRPDHPPQRP

<400> 20

Asp Asp Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Gln Pro Arg Pro Asp His
1 5 10 15
Pro Pro Gln Arg Pro
20

10

15 <210> 21
<211> 23
<212> PRT
<213> *Glycine soja*

<220>
<223> HEDDEDEEEDQPRPDHPPQRP

20 <400> 21

His Glu Asp Asp Glu Asp Glu Asp Glu Glu Glu Asp Gln Pro Arg Pro
1 5 10 15
Asp His Pro Pro Gln Arg Pro
20

25 <210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> *Glycine soja*

30 <220>
<223> SGPLVNP

<400> 22

Ser Gly Pro Leu Val Asn Pro
1 5

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido de glicinina de soja que consiste en SEQ ID NO. 4: SVIKPPTD, que tiene actividad inhibidora de LP (lipasa pancreática) y/o PLA2 (fosfolipasa A2), obtenido por hidrólisis de glicinina de soja con *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2776 y/o un sobrenadante del mismo para su uso en el tratamiento o la prevención de la obesidad y/o tensión oxidativa.
- 10 2. Composición para su uso en el tratamiento o la prevención de la obesidad y/o la tensión oxidativa que comprende el péptido de glicinina de soja según la reivindicación 1 junto con vehículos adecuados.
- 15 3. Producto alimenticio adecuado para el tratamiento de la obesidad y/o la tensión oxidativa que comprende el péptido de glicinina de soja según la reivindicación 1.
4. Producto alimenticio según la reivindicación 3, en el que el péptido está en forma de un extracto.
5. Producto alimenticio según las reivindicaciones 3 a 4, en el que la cantidad de dicho péptido por cantidad total de ración de los productos alimenticios es de 0,01 a 1 g.
- 20 6. Producto alimenticio según las reivindicaciones 3 a 5, que comprende al menos 0,01 g/kg de dicho péptido.
7. Un proceso para la producción de un péptido de glicinina de soja según la reivindicación 1 mediante uso de *Streptococcus thermophilus* CNCM I-2776 o sobrenadantes del mismo en presencia de glicinina de soja.

FIG. 1

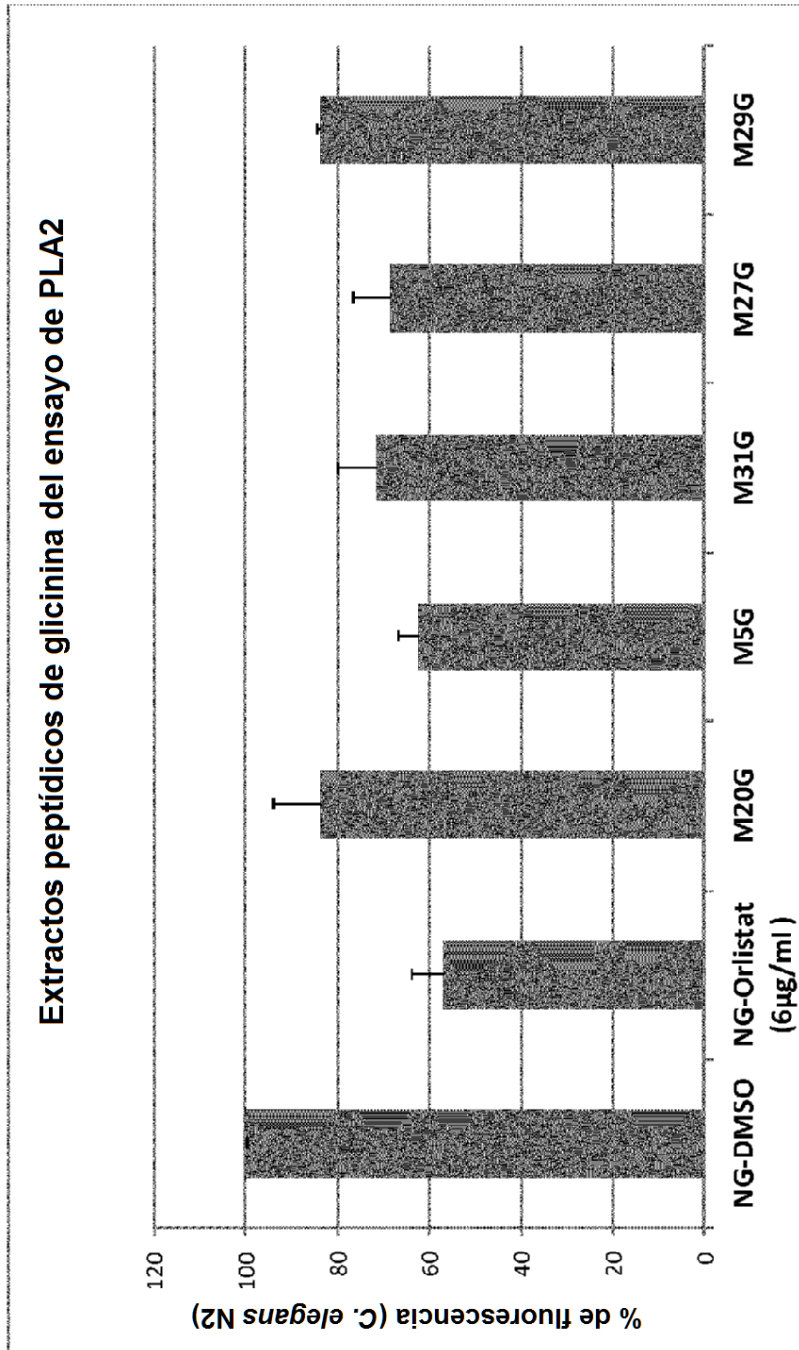


FIG. 2

