

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 166**

21 Número de solicitud: 201331767

51 Int. Cl.:

A61K 38/38 (2006.01)

A23J 3/08 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

04.12.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.07.2015

Fecha de la concesión:

05.05.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.05.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070880

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (CSIC) (90.0%)**

Serrano nº 117

28006 MADRID (Madrid) ES y

UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS (10.0%)

72 Inventor/es:

RIMON GARCES, Marta;

MIGUEL CASTRO, Marta;

LOPEZ FANDIÑO, Rosina;

LOPEZ-MIRANDA GONZALEZ, Visitacion y

URANGA OCIO, Jose

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **USO DE PRODUCTOS BIOACTIVOS MULTIFUNCIONALES DERIVADOS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DE CLARA DE HUEVO PARA EL TRATAMIENTO DEL SÍNDROME METABÓLICO.**

57 Resumen:

El síndrome metabólico es un desorden multifactorial en el que confluyen varias alteraciones que habitualmente requieren de tratamiento farmacológico diferenciado para cada uno de ellas. La presente invención se refiere al uso de un producto bioactivo multifuncional derivado de la hidrólisis enzimática de proteínas de clara de huevo, en la preparación de una composición farmacéutica y/o una composición alimentaria funcional, que presentan utilidad para el tratamiento global de las alteraciones del síndrome metabólico.

ES 2 540 166 B1

DESCRIPCIÓN

Uso de productos bioactivos multifuncionales derivados de la hidrólisis enzimática de proteínas de clara de huevo para el tratamiento del síndrome metabólico.

5

SECTOR DE LA INVENCION

La invención se sitúa en los campos de la industria farmacéutica y alimentaria, ya que específicamente se refiere al nuevo uso de productos bioactivos multifuncionales derivados de la hidrólisis enzimática de proteínas de clara de huevo, en la elaboración de composiciones farmacéuticas y/o alimentarias funcionales que los comprenden y que son útiles en el tratamiento y/o prevención del síndrome metabólico.

15

ESTADO DE LA TECNICA

Durante las últimas décadas el cambio en los hábitos de alimentación y el aumento del sedentarismo han ocasionado un rápido incremento del sobrepeso y la obesidad a edades cada vez más tempranas, lo que ha derivado en un alarmante incremento de la prevalencia del denominado síndrome metabólico (SM) (Groop L, Orho-Melander M. The dysmetabolic syndrome. *Journal of Internal Medicine* 2001, 250: 105-120). Los pacientes que padecen SM presentan, además de obesidad, distintas alteraciones frecuentes en nuestro entorno, tales como dislipidemia, hiperglucemia e hipertensión arterial (HTA).

25

La fisiopatología del SM es extremadamente compleja y sólo se ha dilucidado una parte de ella. Los individuos obesos y, especialmente, aquellos que acumulan grasa a nivel visceral (central) tienen mayor riesgo de padecer SM (Despres JP. Health consequences of visceral obesity. *Annals of Medicine* 2001, 3: 534-541). El número y tamaño de las células que componen principalmente el tejido adiposo, los adipocitos, aumenta a medida que el individuo gana peso. Los adipocitos de los individuos con SM tienen además una actividad lipolítica muy elevada y el exceso de ácidos grasos libres circulantes contribuye de forma adversa al SM y a sus complicaciones. El efecto lipotóxico a largo plazo de los ácidos grasos sobre las células β -pancreáticas colabora en la aparición de insulinoresistencia (IR) y en el desarrollo de DM2. La IR provoca, además, una menor retención de los ácidos grasos libres en los adipocitos, lo que ocasiona un incremento del flujo de ácidos grasos libres de vuelta al hígado. Todos estos procesos contribuyen al desarrollo de complicaciones cardiovasculares (McBride P.

35

Triglycerides and risk for coronary artery disease. *Current Atherosclerosis Reports* 2008, 10: 386-390) y de dislipemia, caracterizada por un aumento de las concentraciones de colesterol total asociado a las lipoproteínas de muy baja (VLDL) y de baja densidad (LDL), valores elevados de la apoproteína B-100, hipertrigliceridemia moderada y disminución del colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Ebbert JO, Jensen M. Fat depots, free fatty acids, and dyslipidemia. *Nutrients* 2013, 5: 498-508).

Los adipocitos segregan, además, moléculas biológicamente activas que reciben el nombre de adipocitoquinas. Estas moléculas actúan sobre múltiples sistemas, regulando diversos procesos metabólicos, y provocando en los pacientes con SM un estado de inflamación crónica leve. Entre ellas el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) ha cobrado especial interés, ya que es capaz de inhibir la actividad y la expresión de la lipoproteinlipasa (LPL), lo que promueve la hipertrigliceridemia que caracteriza al SM. El TNF- α está implicado, además, en el desarrollo de IR y es capaz de reducir la expresión y secreción de la adiponectina, molécula que aumenta la sensibilidad a la insulina (Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999, 257: 79–83).

Se ha demostrado también que hay una fuerte asociación entre la IR y un excesivo acúmulo de lípidos fuera del tejido adiposo, particularmente en el hígado (Noto A, Zahradka P, Yurkova N, Xie X, Nitschmann E, Ogborn M, Taylor CG. Conjugated linoleic acid reduces hepatic steatosis, improves liver function, and favorably modifies lipid metabolism in obese insulin-resistant rats. *Lipids* 2006, 41: 179-188). Esto conduce al desarrollo de esteatosis hepática, enfermedad caracterizada por el acúmulo de depósitos de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos y de las células de Kupffer, que es una de las mayores causas de morbimortalidad relacionada con patologías hepáticas (Barba EJR. Esteatosis hepática, esteatohepatitis y marcadores de lesión hepática. *Revista Mexicana Patología Clínica* 2008, 55: 216-232). El SM se asocia, asimismo, con un aumento del estrés oxidativo en el organismo a diferentes niveles. Hay que tener en cuenta que la IR y posterior hiperglucemia aumenta la producción de radicales libres, y esto se relaciona positivamente con la aparición de enfermedades cardiovasculares.

Uno de los primeros enfoques en el tratamiento del SM debe pasar por una modificación drástica del estilo de vida, orientada principalmente a provocar una reducción del sedentarismo y del peso corporal, mediante un aumento de la actividad física y una disminución en la ingesta calórica, algo difícil de conseguir en la sociedad actual. Esto hace
5 que el tratamiento del SM vaya inevitablemente acompañado de un tratamiento farmacológico. Sin embargo, en la actualidad no existen tratamientos de alta efectividad, por lo que se intenta tratar por separado cada una de las alteraciones que caracterizan el SM, lo que dificulta los tratamientos y hace inevitable tener que instaurar una polimedicación, que exige la coordinación de varios especialistas (internistas, cardiólogos, endocrinos...etc.) y no siempre
10 consigue el objetivo global. Por ello, existe un gran interés en hallar un tratamiento que permita combatir de forma global todas y cada una de sus complicaciones: que incluya principios activos para reducir la obesidad, las cifras de presión arterial, la glucemia y los lípidos plasmáticos y que, idealmente, evite también procesos de agregación plaquetaria. Una posible herramienta relacionada con la intervención en las pautas alimentarias puede basarse
15 en la administración de alimentos funcionales que posean múltiples actividades biológicas, de modo que permitan mejorar las alteraciones funcionales y metabólicas características del SM.

En este sentido, las proteínas se han convertido en una de las fuentes principales para la obtención de alimentos funcionales, puesto que son la materia prima para la obtención de
20 péptidos bioactivos. Estos péptidos funcionales o bioactivos se definen como secuencias específicas de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática (Korhonen H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods* 2009, 1: 177-187).

25 Dentro de la literatura patente se encuentran documentos que se refieren al uso de hidrolizados de proteínas para tratamiento individual de alguna de las alteraciones que caracterizan el SM, así por ejemplo, el documento FR2981544A1 se refiere a la utilización de un hidrolizado de proteínas de suero de leche para la prevención del riesgo
30 cardiometabólico, especialmente indicado para reducir la grasa subcutánea y visceral; el documento EP2173199A1 se refiere a la utilización de hidrolizados de colágeno para disminuir la ingesta calórica, que serían por lo tanto útiles para la prevención y tratamiento del sobrepeso y la obesidad; el documento JP2001061445 se refiere a un hidrolizado proteico que contiene proteínas de clara de huevo que han sido tratadas con proteasas
35 alcalinas y koji para mejorar el metabolismo lipídico, inmune y la unión a minerales; el

documento WO2009128713 se refiere a hidrolizados enzimáticos de ovomucina, ovotransferrina o lisozima con actividad inhibidora de la DPP IV *in vitro* para el tratamiento y/o prevención de la DM2; y el documento JP2008253217 se refiere a la preparación de alimentos y bebidas a base de péptidos derivados de proteínas de huevo para mejorar la

5 circulación sanguínea.

Específicamente, y dentro de la literatura científica, la estructura y funcionalidad de las proteínas de la clara del huevo, consideradas de alto valor biológico, ha sido ampliamente estudiada, y es probablemente la originalidad de este alimento y la diversidad de proteínas

10 que contiene, con muy diferentes propiedades físicoquímicas (masas moleculares y puntos isoelectrónicos), lo que las hace especialmente atractivas para la búsqueda de nuevas moléculas biológicamente activas. Por ejemplo, se han descrito péptidos derivados de proteínas de huevo con actividad antihipertensiva, debida, principalmente, a un mecanismo vasodilatador endotelio-dependiente (García-Redondo AB, Roque FR, Miguel M, López-Fandiño R, Salaices M. Vascular effects of egg white-derived peptides in resistance arteries from rats. Structure-activity relationships *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2010, 90: 1988-1993), y/o a su capacidad para inhibir la enzima convertora de angiotensina (ECA) *in vitro* o *in vivo* (Miguel M, Recio I, Gómez-Ruiz JA, Ramos M, López-Fandiño R. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white

15 proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection* 2004, 67: 1914-1920; Miguel M, Manso MA, Martín-Alvarez PJ, Aleixandre A, López-Fandiño R. Angiotensin-converting enzyme activity in plasma and tissues of spontaneously hypertensive rats after the short and long-term intake of hydrolysed egg white. *Molecular Nutrition and Food Research* 2007, 51:555-563), y con propiedades antioxidantes, bien por su capacidad neutralizadora de radicales libres (Jung WK, Nam KS, Shaidi F, Kim SK. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg. *JAOCS* 2001, 78: 651-656), por su capacidad de inhibir la oxidación de las LDLs y producir por ello efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico (Manso MA, Miguel M, Even J, Hernández R, Aleixandre A, López-Fandiño R. Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the

20 oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 2008, 109: 361-367), o bien por disminuir el estrés oxidativo asociado a la inflamación (Huang W, Majumder K, Wu J. Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chemistry* 2010, 123: 635-641). Recientemente, también se han descrito péptidos derivados de ovoproteínas

25 con actividad hipoglucémica *in vitro* capaces de inhibir la enzima α -glucosidasa (Yu Z, Yin Y,

30

35

Zhao W, Yu Y, Liu B, Liu J, Chen F. Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. *Food Chemistry* 2011, 129: 1376-1382). Sin embargo, la mayoría de los estudios llevados a cabo en esta línea están realizados *in vitro* y no refieren más de dos propiedades biológicas de forma simultánea, principalmente su capacidad para inhibir la ECA y su capacidad vasodilatadora o antioxidante (Miguel M, Alvarez Y, López-Fandiño R, Alonso MJ, Salaices M. Vasodilator effects of peptides derived from egg white proteins. *Regulatory Peptides* 2007, 140: 131-135; Yamada Y, Iwasaki M, Usui H, Ohinata K, Marczak ED, Lipkowski AW, Yoshikawa M Rapakinin. An anti-hypertensive peptide derived from rapeseed protein, dilates mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats via the prostaglandin IP receptor followed by CCK1 receptor. *Peptides* 2010, 31: 909-914).

Finalmente, el documento de patente WO 2005/012355 publicado con fecha 10/02/2005 (que tiene su origen en la solicitud de prioridad ES200301829 de fecha 31/07/2003) reivindica un producto bioactivo, identificado preferentemente a partir de la hidrólisis enzimática de proteínas clara de huevo, que se caracteriza por:

- a. poseer actividad IECA *in vitro* y/o actividad antihipertensiva *in vivo* y/o actividad antioxidante;
- b. tener un peso molecular comprendido entre 365,2 y 1152,58; y
- c. ser péptido identificado con las secuencias de aminoácidos del grupo siguiente: SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 Y SEQ ID NO 8.

Tabla 1. Secuencias de los péptidos bioactivos

YQIGL	SEQ ID NO 1
IVF	SEQ ID NO 2
RADHPFL	SEQ ID NO 3
FSL	SEQ ID NO 4
FRADHPFL	SEQ ID NO 5
YAEERYPIL	SEQ ID NO 6
RDILNQ	SEQ ID NO 7
SALAM	SEQ ID NO 8

En el ámbito de la anteriormente referida patente se incluyen, tanto los hidrolizados completos, como las fracciones de los mismos de bajo peso molecular, o uno o más de sus péptidos bioactivos constituyentes (incluyendo sus derivados, sus sales farmacéuticamente aceptables y sus mezclas). Del mismo modo, se incluye cualquier composición farmacéutica que los contenga y su uso en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la hipertensión y con actividad IECA y antioxidante; y/o de un aditivo, ingrediente o suplemento alimentario funcional y su uso en la elaboración de un producto alimentario funcional favorable para reducir la hipertensión y con actividad IECA y antioxidante.

10 EXPLICACION DE LA INVENCION

Constituye un aspecto de la invención el uso de un producto bioactivo multifuncional, que preferentemente es un hidrolizado enzimático de proteína de clara de huevo, una fracción de bajo peso molecular del mismo, al menos uno de los péptidos que comprende, sus derivados o sales farmacéuticamente aceptables y/o sus mezclas, en la elaboración de una composición farmacéutica y/o una composición alimentaria funcional eficaz para el tratamiento y/o prevención de las alteraciones que caracterizan el síndrome metabólico.

El producto bioactivo multifuncional es efectivo en el tratamiento y/o prevención simultánea de las alteraciones que caracterizan el SM como la obesidad, la dislipidemia, la resistencia a la insulina, el estrés oxidativo y el estado pro-inflamatorio.

El producto bioactivo es igualmente efectivo en el tratamiento y/o prevención simultánea de los parámetros que se utilizan para el diagnóstico de las alteraciones más frecuentes que caracterizan el SM, elevados niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, aumento del tejido adiposo epididimal, presencia de esteatosis hepática, elevados niveles plasmáticos del factor de necrosis tumoral alfa, alto nivel de estrés oxidativo, elevados niveles de insulina en el plasma, aumento del índice de resistencia a la insulina (HOMA-ir), aumento del índice de funcionalidad de las células β -pancreáticas (HOMA- β) y disminución del índice de sensibilidad a la insulina (QUICKI).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

El problema técnico que resuelve la presente invención es el tratamiento y/o prevención de un desorden multifactorial como el síndrome metabólico, a través de la utilización de un

producto bioactivo multifuncional obtenido a partir de la hidrólisis enzimática de las proteínas de clara de huevo, reivindicado según la patente WO2005/012355, publicada con fecha 10/02/2005 (con origen en la solicitud de prioridad ES 200301829 de fecha 31/07/2003), en adelante producto bioactivo multifuncional, y de la que la presente solicitud reivindica
5 materia inventiva.

Se ha observado por primera vez, que el consumo durante 12 semanas de este producto bioactivo multifuncional, preferentemente en forma de hidrolizado de huevo con pepsina, produce resultados beneficiosos simultáneamente sobre las alteraciones más frecuentes
10 que caracterizan el SM en un modelo murino de este síndrome, las ratas Zucker obesas. De este modo, reduce significativamente los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres (ver Ejemplo 2); reduce de manera significativa el peso del tejido adiposo epididimal y la esteatosis hepática (ver Ejemplos 3 y 4); disminuye el estado pro-inflamatorio dando lugar a niveles plasmáticos del factor de necrosis tumoral alfa significativamente más bajos (ver
15 Ejemplo 5); produce una mejora considerable del estrés oxidativo, puesto que disminuye de forma significativa los niveles de peroxidación lipídica y aumenta la capacidad antioxidante y los niveles de glutatión reducido en el hígado (ver Ejemplos 6 a 8); y disminuye los niveles de insulina en el plasma y causa, además, una clara mejora de los índices de resistencia a la insulina (HOMA-ir), de funcionalidad de las células β -pancreáticas (HOMA- β) y de
20 sensibilidad a la insulina (QUICKI) en los animales con SM (ver Ejemplos 9 y 10).

La principal ventaja técnica del la presente invención es la multiactividad biológica *in vivo* del producto bioactivo multifuncional, lo que permite el tratamiento global de un desorden multifactorial como el SM, que actualmente presenta como alternativa el tratamiento
25 diferenciado de cada una de las alteraciones que lo caracterizan.

En el estado de la técnica se recogen productos bioactivos basados en hidrolizados de proteínas con efectos beneficiosos sobre alguna de las alteraciones que pueden confluir en el SM y que, además, mayoritariamente se refieren a resultados *in vitro*. El experto en el
30 estado de la técnica sabrá que el hecho de que un producto funcional presente actividad *in vitro* no asegura su reproducibilidad en ensayos *in vivo*. Asimismo, la efectividad contra alguna de las alteraciones asociadas al SM, no implica que vayan a ser efectivos contra todas las que se recogen en este documento. De hecho, y como ya se ha explicado, el SM supone una constelación de distintas afecciones que, aunque relacionadas por la activación
35 de rutas inflamatorias en el tejido adiposo, son muy heterogéneas en su etiopatogenia y en

los factores hereditarios y ambientales que las desencadenan e influyen en su desarrollo. La efectividad del producto bioactivo multifuncional objeto de la presente invención radica en la confluencia de más de una propiedad fisiológicamente relevante, lo que se debe, por una parte, a la estructura y composición de aminoácidos de sus péptidos constituyentes y, por
5 otra, a la combinación precisa de dichos péptidos. Ambas características, que dependen de la proteína usada como sustrato, del grado de hidrólisis y de la especificidad de la enzima, y no son extrapolables a cualquier hidrolizado proteico, posibilitan que se afecten algunas funciones fisiológicas de una manera determinada.

10 Otra ventaja adicional de la presente invención, la constituye el hecho de que la ingesta del producto bioactivo multifuncional permite incorporar otras funciones nutricionales básicas, útiles en el mantenimiento de la salud.

Por todo ello constituye un aspecto de la invención, el uso de un producto bioactivo
15 multifuncional en la elaboración de una composición farmacéutica y/o una composición alimentaria funcional eficaz para el tratamiento y/o prevención de las alteraciones que caracterizan el síndrome metabólico, en adelante uso de la invención.

A lo largo del presente documento por "producto bioactivo multifuncional" se entiende el
20 mismo producto que se reivindica en el documento de patente WO2005/012355 y que indistintamente es:

a) un producto identificado a partir de la hidrólisis enzimática de proteínas de la clara de huevo, obtenido por un procedimiento de síntesis química o enzimática o mediante métodos recombinantes, que se caracteriza por presentar actividad IECA *in vitro* y/o actividad
25 antihipertensiva *in vivo* y/o actividad antioxidante; un peso molecular comprendido entre 365,2 y 1152,58; y que comprende alguna de las secuencias de aminoácidos del grupo siguiente: SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 Y SEQ ID NO 8; y también,

b) un producto con idénticas características a las que se indican en el apartado a) y
30 que se obtiene por un procedimiento de hidrólisis de un material de partida que contenga una o más proteínas o péptidos, de origen animal, vegetal o procedentes de microorganismos, preferiblemente ovoalbúmina o clara de huevo cuya secuencia de aminoácidos comprendiese la secuencia de aminoácidos de alguno de los péptidos bioactivos de interés indicados con anterioridad y que comprende los siguientes pasos:

- i) disolver o dispersar el material de partida, a una concentración apropiada, en agua o en una disolución tampón, a un pH adecuado para la actuación de la enzima proteolítica, y
- 5 ii) emplear cualquier enzima proteolítica capaz de romper la proteína presente en el material de partida y proporcionar los péptidos de interés, pero preferiblemente pepsina a un pH entre 2.0 y 3.0; o microorganismos proteolíticos que llevaran a cabo una fermentación del sustrato; todo ello con un tiempo de reacción comprendido entre 10 min y 24 horas, pero, preferiblemente durante un tiempo inferior a 3 horas.
- 10 iii) opcionalmente emplear altas presiones hidrostáticas entre 100 y 1000 MPa, para acelerar la hidrólisis del sustrato sin inhibir la enzima proteolítica y/o modificar el perfil de los péptidos obtenidos.

En un aspecto del uso de la invención, se utiliza un producto bioactivo multifuncional que es el hidrolizado enzimático de proteína de clara de huevo y/o una fracción de bajo peso molecular del mismo y/o al menos uno de los péptidos que comprende y/o sus derivados o sales farmacéuticamente aceptables y/o sus mezclas.

En otro aspecto del uso de la invención, se utiliza un producto bioactivo multifuncional que se obtiene de las proteínas de clara del huevo que provienen de ovoalbúmina pura, clara de huevo, huevo entero, ovoproductos destinados a hostelería y restauración, complementos dietéticos para deportistas, ovoproductos para alimentación animal, cualquiera de sus fracciones, o una purificación de las mismas.

En una realización particular del uso de la invención, se utiliza un producto bioactivo multifuncional que se obtiene por hidrólisis enzimática con pepsina de las proteínas de clara de huevo.

Por "síndrome metabólico o SM" se entiende un desorden multifactorial en el que confluyen varias alteraciones o problemas de salud que aumentan la probabilidad de padecer determinadas patologías como enfermedad cardiovascular o diabetes mellitus. Estos problemas de salud pueden aparecer de forma simultánea o secuencial en un mismo individuo y permiten identificar este síndrome.

Ejemplos de alteraciones o problemas de salud que se incluyen dentro del ámbito de esta invención son, obesidad, dislipidemia, resistencia a la insulina, estrés oxidativo, estado pro-inflamatorio, hiperglucemia o hipertensión arterial (HTA).

- 5 En otro aspecto de la invención, el uso de la invención es efectivo en el tratamiento y/o prevención de una cualquiera de las alteraciones más frecuentes que caracterizan el SM, que se eligen de entre las siguientes, obesidad, dislipidemia, resistencia a la insulina, estrés oxidativo y estado pro-inflamatorio.
- 10 En otro aspecto de la invención, el uso de la invención es efectivo, de forma simultánea, en el tratamiento y/o prevención de las alteraciones más frecuentes que caracterizan el SM y que son obesidad, dislipidemia, resistencia a la insulina, estrés oxidativo y estado pro-inflamatorio.
- 15 En otro aspecto de la invención, el uso de la invención es efectivo en el tratamiento y/o prevención de alguno de los parámetros que se utilizan para el diagnóstico de las alteraciones más frecuentes que caracterizan el SM, que se eligen de entre las siguientes, elevados niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, aumento de tejido adiposo epididimal, presencia de esteatosis hepática, elevados niveles plasmáticos de factor de necrosis
- 20 tumoral alfa, alto nivel de estrés oxidativo, elevados niveles de insulina en el plasma, aumento del índice de resistencia a la insulina (HOMA-ir), aumento del índice de funcionalidad de las células β -pancreáticas (HOMA- β) y disminución del índice de sensibilidad a la insulina (QUICKI).
- 25 En otro aspecto de la invención, el uso de la invención es efectivo, de forma simultánea, en el tratamiento y/o prevención de los parámetros más frecuentes que se utilizan para el diagnóstico de las alteraciones más frecuentes que caracterizan el SM y que son, elevados niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, aumento de tejido adiposo epididimal, presencia de esteatosis hepática, elevados niveles plasmáticos de factor de necrosis tumoral alfa, alto
- 30 nivel de estrés oxidativo, elevados niveles de insulina en el plasma, aumento del índice de resistencia a la insulina (HOMA-ir), aumento del índice de funcionalidad de las células β -pancreáticas (HOMA- β) y disminución del índice desensibilidad a la insulina (QUICKI).

35 El producto bioactivo multifuncional que se utiliza en la presente invención puede ser sometido a un tratamiento térmico, como la pasteurización, o bien someterse a secado o

lío-filización, lo que permite su utilización a través de productos farmacéuticos o productos alimentarios funcionales, aditivos o ingredientes alimentarios, para el tratamiento y/o prevención de las patologías del SM, principalmente en seres humanos, aunque también en animales.

5

Constituye otro aspecto de la invención, una composición farmacéutica, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende el producto bioactivo multifuncional o una sal farmacéuticamente aceptable y que es eficaz para el tratamiento y/o prevención de las alteraciones que caracterizan el SM.

10

Dentro del alcance de esta invención, se encuentran las sales, solvatos y pro-fármacos farmacéuticamente aceptables del producto bioactivo multifuncional que cuando se administran a un paciente son capaces de proporcionar (directamente o indirectamente) un compuesto, según se describe en el presente documento. Sin embargo, se apreciará que las sales farmacéuticamente no aceptables también están dentro del alcance de la invención ya que éstas pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de sales, solvatos, pro-fármacos y derivados puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica.

15

20

Por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables de compuestos previstos en el presente documento, se sintetizan mediante métodos químicos convencionales a partir de un compuesto original que contiene un resto básico o ácido. Generalmente, tales sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de los compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Ejemplos de sales de adición de ácidos incluyen sales de ácido mineral tales como, por ejemplo, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato y sales de adición de ácido orgánico tales como, por ejemplo, acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y p-toluensulfonato. Ejemplos de sales de adición de bases incluyen sales inorgánicas tales como, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, y sales de bases orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquilenetanolamina, trietanolamina, glucamina y sales de aminoácidos básicos.

25

30

El término "pro-fármaco o pro-droga" se usa en su sentido más amplio y abarca aquellos derivados que se convierten *in vivo* en productos adecuados para el tratamiento del SM.

Los pro-fármacos particularmente favoritos son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los productos bioactivos multifuncionales cuando se administran tales compuestos a un paciente (por ejemplo, haciendo que un compuesto administrado por vía oral se absorba más fácilmente por la sangre), o que potencian la liberación del compuesto original en un compartimento biológico con relación a la especie original. La preparación de dicho pro-fármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

5

En otro aspecto de la invención, la composición farmacéutica de la invención adicionalmente utiliza al menos un excipiente, un adyuvante y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, oral, parenteral (subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, etc.), rectal, etc.

10

La composición farmacéutica de la invención puede estar en una forma farmacéutica de administración por vía oral, bien en forma sólida o líquida. Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensoactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones, o en cualquier libro de similares características que exista en cada país.

20

25

30

En otro aspecto de la invención, la composición farmacéutica de la invención comprende otro principio activo.

Constituye otro aspecto de la invención, una composición alimentaria funcional, en adelante composición alimentaria funcional de la invención, que comprende el producto bioactivo multifuncional eficaz para el tratamiento y/o la prevención de las alteraciones que caracterizan el SM.

5

Se entiende por “composición alimentaria funcional” cualquier combinación de ingredientes constitutiva de un producto alimentario sólido o líquido, que adicionalmente a sus características nutricionales, comprende funciones específicas que ayudan a mejorar la salud y a reducir el riesgo de contraer enfermedades.

10

En el ámbito de la presente invención se incluye el uso del producto bioactivo multifuncional y/o de la composición farmacéutica de la invención y/o de la composición alimentaria funcional de la invención para el tratamiento y/o prevención de las alteraciones que caracterizan el SM.

15

También se incluye dentro del ámbito de la presente invención cualquier método de tratamiento y/o prevención de las alteraciones que caracterizan el SM, que consiste en la administración de una dosis efectiva del producto bioactivo multifuncional y/o de la composición farmacéutica de la invención y/o de la composición alimentaria funcional de la invención.

20

La dosificación del producto bioactivo multifuncional tal y como se define en el presente documento, variará dependiendo de numerosos factores, como la edad, severidad de la patología, vía de administración y frecuencia de la dosis.

25

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas. Para el experto en la materia, otros aspectos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30

Breve descripción del contenido de las figuras

5 **Figura 1. Concentración plasmática de ácidos grasos libres de ratas tratadas con el producto bioactivo multifuncional vs ratas control.** Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (◐) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina. Los datos representan los valores medios en $\mu\text{M} \pm \text{EEM}$ para un mínimo de 9 animales.

10 **Figura 2. Peso total y peso relativo de los órganos obtenidos de ratas tratadas con el producto bioactivo multifuncional vs ratas control.** Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (◐) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina. Los datos representan los valores medios en $\text{g} \pm \text{EEM}$ para un mínimo de 9
15 animales.

Figura 3. Imágenes tomadas en el microscopio óptico (objetivo 40x) de cortes de hígado teñidos con hematoxilina–eosina de ratas tratadas con el producto bioactivo multifuncional vs ratas control. Grupos experimentales: Ratas Zucker delgadas que
20 bebieron agua (A), Ratas Zucker obesas que bebieron agua (B), Ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina (C). Liposomas señalados con flechas.

Figura 4. Concentración plasmática de factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) de ratas tratadas con el producto bioactivo multifuncional vs ratas control. Grupos
25 experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (◐) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina. Los datos representan los valores medios en $\text{pg/ml} \pm \text{EEM}$ para un mínimo de 9 animales.

30 **Figura 5. Concentración plasmática de malonildialdehído (MDA) de ratas tratadas con el producto bioactivo multifuncional vs ratas control.** Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (◐) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con

pepsina. Los datos representan los valores medios en nmol/ml plasma \pm EEM para un mínimo de 9 animales.

Figura 6. Capacidad antioxidante del plasma medida a través de los radicales libres de oxígeno de ratas tratadas con el producto bioactivo multifuncional vs animales control. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (⊙) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina. Los datos representan los valores medios en μ mol eq Trolox/ μ l plasma \pm EEM para un mínimo de 9 animales.

Figura 7. Concentración de glutatión reducido en el tejido hepático de ratas tratadas con el producto bioactivo multifuncional vs ratas control. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (⊙) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 0.75 g/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina. Los datos representan los valores medios en μ M/ g proteína \pm ESM para un mínimo de 9 animales.

Figura 8. Concentración plasmática de glucosa (A) y concentración plasmática de insulina (B) de ratas tratadas con el producto bioactivo multifuncional vs ratas control. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (⊙) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina. Los datos representan los valores medios en mg/dl para la glucosa y en ng/ml para la insulina \pm EEM para un mínimo de 9 animales.

Figura 9. Índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) (A), índice de secreción de insulina en las células β -pancreáticas (HOMA- β) (B) e índice cuantitativo de sensibilidad a la insulina (QUICKI) (C) de ratas tratadas con el producto bioactivo multifuncional vs ratas control. Grupos experimentales: (○) Ratas Zucker delgadas que bebieron agua, (●) ratas Zucker obesas que bebieron agua, (⊙) ratas Zucker obesas que recibieron una dosis de 750 mg/kg/día de clara de huevo hidrolizada con pepsina. Los datos representan los valores medios \pm EEM para un mínimo de 9 animales.

MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION**Selección de animales, administración del producto bioactivo multifuncional y obtención de muestras**

5 Para llevar a cabo este estudio se utilizaron 20 ratas Zucker obesas macho de 8 semanas de vida con un peso comprendido entre 265 y 275 g, y 10 ratas Zucker delgadas machos de 8 semanas de vida, con un peso comprendido entre 150 y 175 g. Todos los animales procedían de Charles River Laboratories (España) y llegaron al animalario de la Universidad Rey Juan Carlos con 7 semanas de vida. Después de un periodo de adaptación, se
10 colocaron en grupos de 5 animales, en jaulas transparentes (40 cm×28cm×25 cm) con un lecho de viruta que fue reemplazado cada 4-5 días y se mantuvieron en condiciones controladas, con una temperatura ambiental estable de 23 °C, humedad del 60 % y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales se alimentaron *ad libitum* durante todo el estudio, con una dieta sólida estándar (Harlan Laboratories, Estados Unidos) y agua corriente filtrada
15 que fue renovada periódicamente. Para garantizar el mantenimiento del bienestar animal, a medida que los animales fueron desarrollando obesidad fue necesario separarlos en grupos más pequeños (2 animales/jaula).

Al comienzo del estudio, las ratas Zucker obesas se dividieron en 2 grupos, de 10 animales
20 cada uno. Cada uno de los grupos ingirió como producto líquido, desde la semana 8 hasta la semana 20 de vida, agua o 750 mg/kg/día del producto bioactivo multifuncional que en este caso fue el hidrolizado de clara de huevo con pepsina, disuelto en el agua de bebida. Esta solución se ajustó semanalmente teniendo en cuenta el volumen de líquido ingerido la semana anterior. Durante el periodo experimental se controló semanalmente el peso
25 corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida de los animales. Al final del periodo experimental, y después de un periodo de ayuno de 16 horas, las ratas se sacrificaron por decapitación con guillotina y se recogieron muestras de sangre en tubos que contenían heparina de litio como anticoagulante (BD Vacutainer CPT, Reino Unido). El plasma obtenido se congeló a -80 °C hasta su uso para efectuar las siguientes determinaciones bioquímicas:
30 glucosa, insulina, ácidos grasos libres, TNF- α , malonildialdehído y capacidad antioxidante.

A continuación, se abrió el tórax y el abdomen de los animales sacrificados, y se extrajo el hígado y el tejido adiposo blanco epididimal. Todos los órganos se limpiaron, se pesaron y se congelaron a -80°C. El peso relativo de cada uno de los órganos se calculó dividiendo el
35 peso de cada órgano por el peso total del animal correspondiente. Una muestra de hígado

se guardó en paraformaldehído al 10 % para realizar estudios histológicos, y otra muestra se almacenó congelada a -80 °C para determinar la concentración de glutatión reducido en este tejido.

5 **Procedimientos analíticos**

Determinación de ácidos grasos libres en plasma

Para determinar los ácidos grasos libres del plasma se utilizó un kit colorimétrico comercial (EnzyChrom Free Fatty Acid Assay Kit, BioAssay Systems, Estados Unidos) basado en la reacción enzimática de los ácidos grasos libres con la Acil-CoA que forman peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La intensidad de color se midió a 37 °C con un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy), a una longitud de onda de 570 nm. La intensidad de color formada es directamente proporcional a la concentración de ácidos grasos libres en la muestra. Como patrón se realizó una curva estándar de ácido palmítico (0-1000 μM).

15

La concentración de ácidos grasos libres presentes en cada muestra se calculó de la siguiente forma:

$$\begin{array}{l}
 \text{Concentración de} \\
 \text{ácidos grasos libres}
 \end{array}
 = \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}}{\text{Pendiente } (\mu\text{M}^{-1})} \times n \text{ } (\mu\text{M})$$

Donde:

- Abs_{muestra} y Abs_{blanco}: Absorbancia de la muestra y absorbancia del blanco a 572 nm, respectivamente.

25

- Pendiente: Pendiente de la recta patrón.

- n: Factor de dilución de la muestra.

30 **Estudio histológico del hígado**

Para llevar a cabo el estudio histopatológico del hígado, una muestra de este tejido se fijó en solución de formaldehído al 10 % en PBS durante un mínimo de 48 horas y posteriormente se procesó para su inclusión en parafina en un procesador automático Thermo Shandon (Thermo Fisher Scientist, Estados Unidos). Una vez embebido en parafina se cortó con un

5 micrótopo Microm (MICROM International GmbH, Alemania) en secciones de 5 μm . A continuación, las preparaciones se tiñeron con hematoxilina-eosina (H & E) para su estudio general y con la tinción de Van Gieson para la determinación de fibrosis. La observación se realizó con un microscopio Zeiss Axioskop 2 (Zeiss MicroImaging GmbH, Alemania) equipado con el programa de análisis de imagen AxioVision 4.6 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemania).

Determinación de los niveles de factor de necrosis tumoral en plasma

10 Para determinar las concentraciones plasmáticas de factor de necrosis tumoral (TNF- α) se usaron los kit de ELISA directos, específicos para rata de TNF- α (Invitrogen). La cuantificación se llevó a cabo a una longitud de onda de 450 nm con un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy). Los resultados de los niveles de TNF- α se expresan como pg de TNF- α /ml de plasma.

15 Determinación de malonildialdehído en plasma

Para determinar los niveles de malonildialdehído (MDA) en el plasma de las ratas se utilizó el ensayo modificado del ácido tiobarbitúrico (TBA). Para ello, el plasma se mezcló con ácido tricloroacético al 20 % en 0.6 M HCl (1:1 v/v), y los tubos se mantuvieron en hielo durante 20 minutos para precipitar los componentes del plasma, evitando así, posibles interferencias. Las muestras se centrifugaron a 1500 g durante 15 minutos. A continuación, se añadió el TBA (Sigma) (120 mM en Tris 260 mM y pH 7) al sobrenadante en una proporción 1:5 (v/v), y la mezcla se calentó a 97°C durante 30 minutos. La reacción entre MDA y TBA produce un pigmento estable de color rojo-rosáceo, con un coeficiente de absorción molar de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en el espectro visible (535 nm). En este aducto, la proporción MDA:TBA es de 1:2. Para la medida de la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy, Estados Unidos), controlado por el software Gen 5 1.06. Las concentraciones de MDA en plasma se expresan como nmol de MDA/ml de plasma.

30 Medida de la capacidad antioxidante del plasma

Para determinar la actividad antioxidante, se utilizó el ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) y se utilizó fluoresceína como sustrato oxidable. Este ensayo mide la capacidad que tienen los antioxidantes presentes en una muestra para neutralizar los radicales peroxilo, que se originan a partir de la descomposición térmica del 2,2'-azo-bis-(2-

metilpropionamidina) dihidrocloruro (AAPH) y que causa la oxidación de la fluoresceína que actúa como sustrato (FIG 5). Como antioxidante de referencia se utilizó el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), análogo soluble de la vitamina E.

- 5 El AAPH, el trolox y las muestras de plasma se diluyeron en tampón fosfato (75 mM, pH 7.4). El trolox se diluyó para obtener diferentes concentraciones (0.2 - 2 nmol) con las que se construyó una curva de calibrado de referencia. Las soluciones de AAPH y trolox se prepararon diariamente. Se preparó también una solución stock de fluoresceína (1.17 mM) en el mismo tampón, que se almacenó en oscuridad a 4 °C durante 4 semanas. La reacción
10 se llevó a cabo en un volumen final de 200 µl (20 µl de la muestra correspondiente, 120 µl de fluoresceína y 60 µl de AAPH).

La fluorescencia se midió usando un fluorímetro (FLUOstar OPTIMA), siendo la longitud de onda de excitación de 485 nm y la de emisión 520 nm. Se utilizaron placas multipocillo de poliestireno negras (Nunc, Dinamarca), y la medida de fluorescencia se realizó a 40 °C cada
15 minuto, durante 135 minutos. Las medidas de fluorescencia se normalizaron con respecto al blanco (no antioxidante). A partir de las curvas normalizadas se calculó el área bajo la curva (AUC) de descenso de fluorescencia utilizando la siguiente fórmula:

20

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i / f_0$$

Donde f_0 es la lectura de la fluorescencia inicial a 0 minutos y f_i es la lectura de fluorescencia después de i minutos.

25

Todas las muestras se prepararon por triplicado y se llevaron a cabo al menos tres ensayos independientes para cada muestra. Los valores de ORAC se expresan como µmol de equivalentes de trolox/µl de plasma, usando para ello la curva del patrón calculada para cada ensayo.

30

Homogeneización y determinación de glutatión reducido en tejido hepático.

Para llevar a cabo las determinaciones de glutatión reducido, las muestras de hígado se homogeneizaron en tampón fosfato a pH 7.4 (Sigma) a 4 °C utilizando un homogeneizador

de vidrio. Posteriormente, los homogeneizados se centrifugaron a 5000 g y 4 °C durante 15 minutos, y se recogieron alícuotas los sobrenadantes, que se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

5 El contenido de glutatión reducido en el hígado se determinó por el método fluorimétrico monoclorobimane. Para ello, 90 µl de sobrenadante de homogeneizado de hígado se depositaron en una placa multipocillo de poliestireno negra, y se añadieron a la placa 10 µl de una solución que contenía glutatión S-transferasa (1U/ml) obtenida de hígado de caballo (Sigma) y monoclorobimane 1 mM (Fluka Biochemical, Suiza). La placa se incubó a
10 temperatura ambiente protegida de la luz durante 30 minutos. Durante este tiempo tiene lugar una reacción en la que el glutatión se une al monoclorobimane, generando un complejo fluorescente. Esta reacción está catalizada por la glutatión S-transferasa. Transcurrido dicho tiempo, se procedió a cuantificar la concentración del complejo, y por lo tanto de glutatión, mediante un fluorímetro (FLUOstar OPTIMA), a una longitud de onda de
15 excitación de 390 nm y de emisión de 510 nm. Para determinar el contenido de proteínas en las muestras de hígado, se utilizó la técnica espectrofotométrica descrita en el apartado 3.2.5. Las concentraciones de glutatión reducido en el hígado se expresan como µmol de glutatión reducido/g de proteína.

20 **Determinación de glucosa e insulina en plasma**

Para obtener los valores de glucosa en plasma se utilizaron kits comerciales basados en métodos enzimático-colorimétricos (Spinreact S.A/S.A.U, España). Para ello se pipetearon 10 µl de plasma y se añadió 1 ml de reactivo, la mezcla se incubó durante 10 minutos a
25 temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy). Los resultados se expresan como mg de glucosa/dl de plasma.

Para determinar la concentración de insulina plasmática se utilizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) de tipo directo con un kit comercial ultrasensible específico para
30 rata (Mercodia AB, Suecia). La lectura se realizó a 450 nm con un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy). Los niveles de insulina en el plasma se expresan en µg de insulina/L de plasma.

Cálculo de Índices HOMA-IR, HOMA-β y QUICKI

El valor de la concentración plasmática de insulina, junto con el valor de la concentración plasmática de glucosa en los animales sacrificados, se utilizaron para calcular el índice de resistencia a la insulina [“homeostasis model assessment” (HOMA)-IR] y el índice de secreción de insulina en las células β pancreáticas [HOMA-β]. También se calculó el índice cuantitativo de sensibilidad a la insulina [“Quantitative Insulin Sensitivity Check Index” (QUICKI)]. Las fórmulas que proporcionan los valores de los índices mencionados figuran a continuación:

$$\text{HOMA-IR} = \text{insulina en ayunas } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glucosa en ayunas (mm)}/22.5$$

$$\text{HOMA-}\beta = 20 \times \text{insulina en ayunas } (\mu\text{U/ml})/[\text{glucosa en ayunas (mm)}-3.5]$$

$$\text{QUICKI} = 1/[\log \text{insulina en ayunas } (\mu\text{U/ml}) + \log \text{glucosa en ayunas (mg/dl)}].$$

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los animales se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM) de, al menos, 7 animales. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el test de la “t de student” para datos no apareados. Se considera siempre significativa la diferencia para valores de $P < 0.05$. Para llevar a cabo el análisis estadístico se empleó el programa estadístico Graph-Pad Prism versión 4.00 para Windows (Graph-Pad Software, San Diego, CA). Se realizaron las siguientes comparaciones: * $P < 0.05$ ratas delgadas vs ratas obesas que bebieron agua, # $P < 0.05$ ratas obesas que bebieron agua vs ratas obesas que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina.

Ejemplo 1. Obtención de un producto bioactivo multifuncional que es un hidrolizado de clara de huevo con pepsina

El hidrolizado se obtuvo empleando como sustrato clara de huevo de gallina, procedente de clara de huevo pasteurizada comercial. Como enzima, se utilizó pepsina de grado alimentario, procedente de estómago de cerdo. El pH de la clara se ajustó a 7.0 añadiendo HCl 37% de grado alimentario. Se añadió la pepsina (relación enzima/sustrato 2:100, p/p). La hidrólisis se realizó a una temperatura de 37 °C durante 8 horas, a presión atmosférica (0.1 MPa) en un baño termostático con agitación. La inactivación de la pepsina se consiguió elevando el pH con NaOH de grado alimentario 5 M. Posteriormente se centrifugaron las

muestras durante 15 min a 4000 g para obtener el sobrenadante, que se utilizó en los ensayos con ratas.

5 Ejemplo 2. Efecto del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre los niveles de ácidos grasos en el plasma de ratas Zucker obesas

Los resultados mostraron que la concentración plasmática de ácidos grasos libres fue significativamente superior en las ratas Zucker obesas respecto a sus controles, las ratas Zucker delgadas. En las ratas Zucker obesas que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina se observó una disminución significativa en la concentración plasmática de ácidos grasos libres en comparación con las ratas obesas que bebieron agua (FIG 1).

15 Ejemplo 3. Efecto del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre el tamaño del tejido adiposo en el plasma de ratas Zucker obesas

En lo que respecta al tejido adiposo epididimal, tanto su peso como su peso relativo fueron significativamente superiores en los grupos de ratas Zucker obesas respecto a las delgadas. Estos parámetros fueron, además, significativamente menores en las ratas Zucker obesas que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina en comparación con las ratas Zucker obesas que bebieron agua (FIG 2).

20 Ejemplo 4. Efecto del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre el grado de esteatosis hepática en las ratas Zucker obesas

25 Los cortes histológicos de tejido hepático teñidos con hematoxilina-eosina analizados al microscopio óptico muestran una clara diferencia en la apariencia de los hígados entre los distintos grupos experimentales (FIG 3). El hígado de las ratas Zucker delgadas no presentó signos de patología hepática, ni linfocitos T o B extravasculares (FIG 3A). Por el contrario, en los hígados de las ratas Zucker obesas que bebieron agua se observó una clara esteatosis, con una distribución heterogénea de vesículas de grasa principalmente de tipo microvesicular (FIG 3B). Aunque en todos los cortes de tejido hepático correspondientes a los animales obesos se observó una ligera infiltración linfocitaria, no se detectaron signos de fibrosis en ninguno de los grupos. Sin embargo, la gravedad de la esteatosis no fue la misma en todos los grupos de ratas obesas, ya que las ratas Zucker obesas que recibieron

el hidrolizado de clara de huevo con pepsina mostraron un sorprendente menor grado de esteatosis, con menos vesículas grasas y de menor tamaño (FIG 3C).

5 Ejemplo 5. Efecto del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre los niveles de factor de necrosis tumoral alfa en el plasma de ratas Zucker obesas

Los niveles de TNF- α en las ratas Zucker obesas fueron 3 veces superiores a los de las ratas delgadas (FIG 4). El aumento del TNF- α caracteriza los principales modelos experimentales de obesidad, entre los que se incluye el modelo de las ratas Zucker obesas que hemos utilizado. Esto puede deberse a la hipertrofia que manifiestan los adipocitos en estos animales, lo que favorece la producción de citoquinas proinflamatorias como es el TNF- α . Las ratas Zucker obesas que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina presentaron sin embargo una disminución significativa de los niveles de TNF- α en el plasma.

15 Ejemplo 6. Efecto del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre los niveles de malonildialdehido en el plasma de ratas Zucker obesas

Las ratas Zucker obesas que bebieron agua presentaron un aumento significativo en los niveles plasmáticos de MDA respecto a las ratas Zucker delgadas (FIG 5). El consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina disminuyó significativamente los valores de MDA en los animales obesos. Estos datos indican que el grado de peroxidación lipídica es mayor en los animales obesos que en los delgados, y que el aumento de los niveles de MDA en individuos que padecen SM, se reduce con el consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina.

25

Ejemplo 7. Efecto del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre la capacidad antioxidante del plasma en ratas Zucker obesas

El valor del ORAC obtenido nos proporciona la capacidad del plasma para neutralizar radicales peroxilo. Este valor fue similar en el plasma de las ratas Zucker delgadas y en de las ratas Zucker obesas que bebieron agua (FIG 6). Sin embargo, las ratas Zucker obesas que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina experimentaron un aumento en la capacidad antioxidante plasmática.

30

Ejemplo 8. Efecto del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre los niveles de glutatión reducido en el hígado de ratas Zucker obesas

Las ratas Zucker obesas que bebieron agua presentaron una disminución significativa de los niveles de glutatión reducido (considerado el principal antioxidante celular) en el tejido hepático respecto a los niveles de esta molécula registrados en los animales delgados (FIG 7). Los niveles de glutatión reducido aumentaron significativamente en las ratas Zucker obesas que recibieron el hidrolizado de clara de huevo con pepsina con respecto a las ratas Zucker obesas que bebieron agua.

Ejemplo 9. Efecto del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre los niveles de glucosa e insulina en el plasma de ratas Zucker obesas

En lo que respecta a la glucemia, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de ratas Zucker obesas y ratas Zucker delgadas (FIG 8A). Las concentraciones plasmáticas de insulina fueron, sin embargo, mayores en las ratas Zucker obesas que en las ratas delgadas (FIG 8B). Estos datos se corresponden con lo descrito para este modelo animal, que desarrolla hiperinsulinemia sin presentar niveles plasmáticos de glucosa elevados, y en el que la IR aparece cuando las ratas Zucker obesas son jóvenes, aproximadamente a las 7 semanas de vida. Tampoco se observaron cambios en los niveles de glucosa en los animales obesos que recibían hidrolizado de clara de huevo con pepsina, pero en el grupo de animales que consumieron el hidrolizado si se observó una reducción significativa en la concentración de insulina plasmática (FIG 8B).

Ejemplo 10. Efecto del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre los índices HOMA-ir, HOMA- β y QUICKI en ratas Zucker obesas

Las ratas Zucker obesas presentaron valores significativamente más altos de HOMA-ir (FIG 9A) y HOMA- β (FIG 9B), así como un valor más bajo de QUICKI (FIG 9C) que las ratas Zucker delgadas. Estos resultados resultan lógicos ya que los animales obesos de esta raza muestran IR e indican que existe además una disfunción de las células β -pancreáticas en las ratas Zucker obesas. Las ratas Zucker obesas que recibieron los hidrolizados de huevo con pepsina presentaron valores significativamente más bajos de HOMA-ir y HOMA- β , así como un valor más alto de QUICKI que las ratas Zucker obesas que bebieron agua. Al mostrar los tejidos menor resistencia a la insulina, pueden captarla mejor y los

requerimientos de esta hormona disminuyen. Por este motivo, la capacidad secretora de las células β -pancreáticas no necesita ser tan alta. Más aún, el incremento en el valor del índice QUICKI observado en las ratas Zucker obesas que consumieron el hidrolizado de pepsina indica que este grupo de animales desarrollan además un mecanismo compensador para

5 aumentar la sensibilidad a la insulina.

REIVINDICACIONES

1.- Uso de un producto bioactivo multifuncional identificado a partir de la hidrólisis enzimática de proteínas de la clara de huevo, obtenido por un procedimiento de síntesis química o enzimática o mediante métodos recombinantes y que se caracteriza por:

- i) actividad IECA *in vitro* y/o actividad antihipertensiva *in vivo* y/o actividad antioxidante,
- ii) un peso molecular comprendido entre 365,2 y 1152,58, y
- iii) ser péptido identificado con las secuencias de aminoácidos del grupo siguiente: SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 Y SEQ ID NO 8;

en la elaboración de una composición farmacéutica y/o una composición alimentaria funcional eficaz para el tratamiento y/o prevención de las alteraciones que caracterizan el síndrome metabólico.

2.- Uso de un producto bioactivo multifuncional que se obtiene por un procedimiento de hidrólisis de un material de partida que contenga una o más proteínas o péptidos, de origen animal, vegetal o procedentes de microorganismos, cuya secuencia de aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos de alguno de los péptidos bioactivos según la reivindicación 1 y que comprende los siguientes pasos:

- i) disolver o dispersar el material de partida, a una concentración apropiada, en agua o en una disolución tampón, a un pH adecuado para la actuación de la enzima proteolítica,
- ii) emplear cualquier enzima proteolítica capaz de romper la proteína presente en el material de partida y proporcionar los péptidos de interés o microorganismos proteolíticos que llevarán a cabo una fermentación del sustrato, todo ello con un tiempo de reacción comprendido entre 10 min y 24 horas, y
- iii) opcionalmente emplear altas presiones hidrostáticas comprendidas entre 100 y 1000 MPa, para acelerar la hidrólisis del sustrato sin inhibir la enzima proteolítica y/o modificar el perfil de los péptidos obtenidos;

en la elaboración de una composición farmacéutica y/o una composición alimentaria funcional eficaz para el tratamiento y/o prevención de las alteraciones que caracterizan el síndrome metabólico.

3.- Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que el producto bioactivo multifuncional es el hidrolizado enzimático de proteína de clara de huevo y/o una fracción de bajo peso molecular del mismo y/o al menos uno de los péptidos que comprende y/o sus derivados o sales farmacéuticamente aceptables y/o sus mezclas.

5

4.- Uso según la reivindicación 3, caracterizado por que el producto bioactivo multifuncional se obtiene de las proteínas de clara del huevo que provienen de ovoalbúmina pura, clara de huevo, huevo entero, ovoproductos destinados a hostelería y restauración, complementos dietéticos para deportistas, ovoproductos para alimentación animal, cualquiera de sus fracciones, o una purificación de las mismas.

10

5.- Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el producto bioactivo multifuncional se obtiene de la hidrólisis enzimática con pepsina de las proteínas de clara de huevo.

15

6.- Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que es efectivo en el tratamiento y/o prevención de una cualquiera de las alteraciones que caracterizan el síndrome metabólico y que se elige de entre, obesidad, dislipidemia, resistencia a la insulina, estrés oxidativo y estado pro-inflamatorio.

20

7.- Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que es efectivo de forma simultánea en el tratamiento y/o prevención de las siguientes alteraciones que caracterizan el síndrome metabólico, obesidad, dislipidemia, resistencia a la insulina, estrés oxidativo y estado pro-inflamatorio.

25

8.- Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que es efectivo en el tratamiento y/o prevención de uno cualquiera de los parámetros que se utilizan para el diagnóstico de las alteraciones más frecuentes que caracterizan el síndrome metabólico y que se elige de entre, elevados niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, aumento del tejido adiposo epididimal, presencia de esteatosis hepática, elevados niveles plasmáticos del factor de necrosis tumoral alfa, alto nivel de estrés oxidativo, elevados niveles de insulina en el plasma, aumento del índice de resistencia a la insulina (HOMA-ir), aumento del índice de funcionalidad de las células β -pancreáticas (HOMA- β) y disminución del índice de sensibilidad a la insulina (QUICKI).

35

9.- Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque es efectivo de forma simultánea en el tratamiento y/o prevención de los siguientes parámetros que se utilizan para el diagnóstico de las alteraciones más frecuentes que caracterizan el síndrome metabólico, elevados niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, aumento del tejido adiposo epididimal, presencia de esteatosis hepática, elevados niveles plasmáticos del factor de necrosis tumoral alfa, alto nivel de estrés oxidativo, elevados niveles de insulina en el plasma, aumento del índice de resistencia a la insulina (HOMA-ir), aumento del índice de funcionalidad de las células β -pancreáticas (HOMA- β) y disminución del índice de sensibilidad a la insulina (QUICKI).

5

10

FIG 1

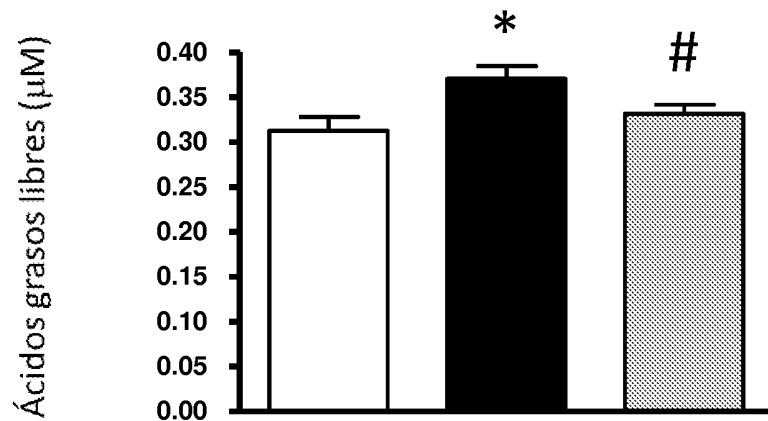


FIG 2

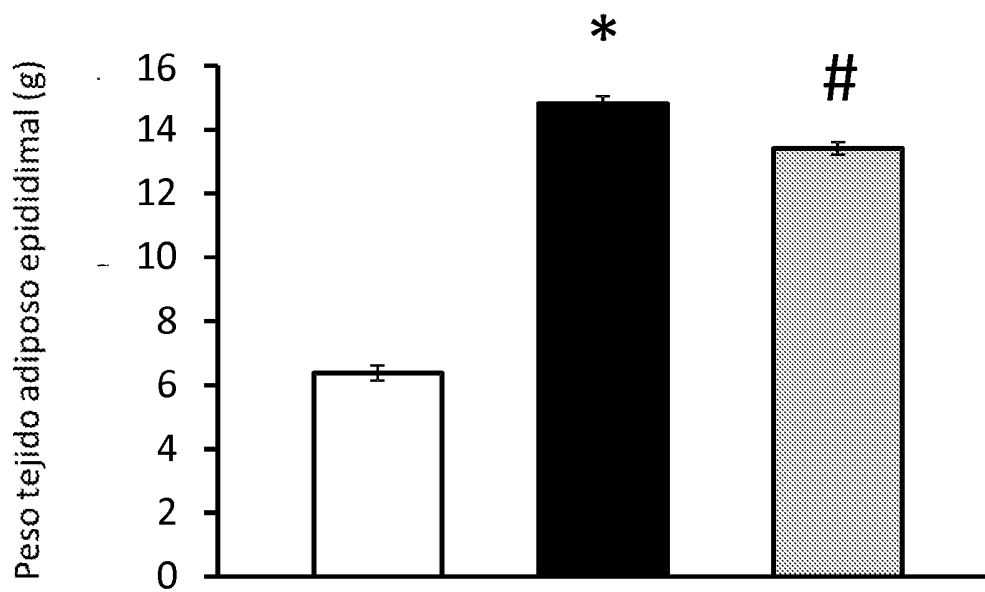


FIG 3

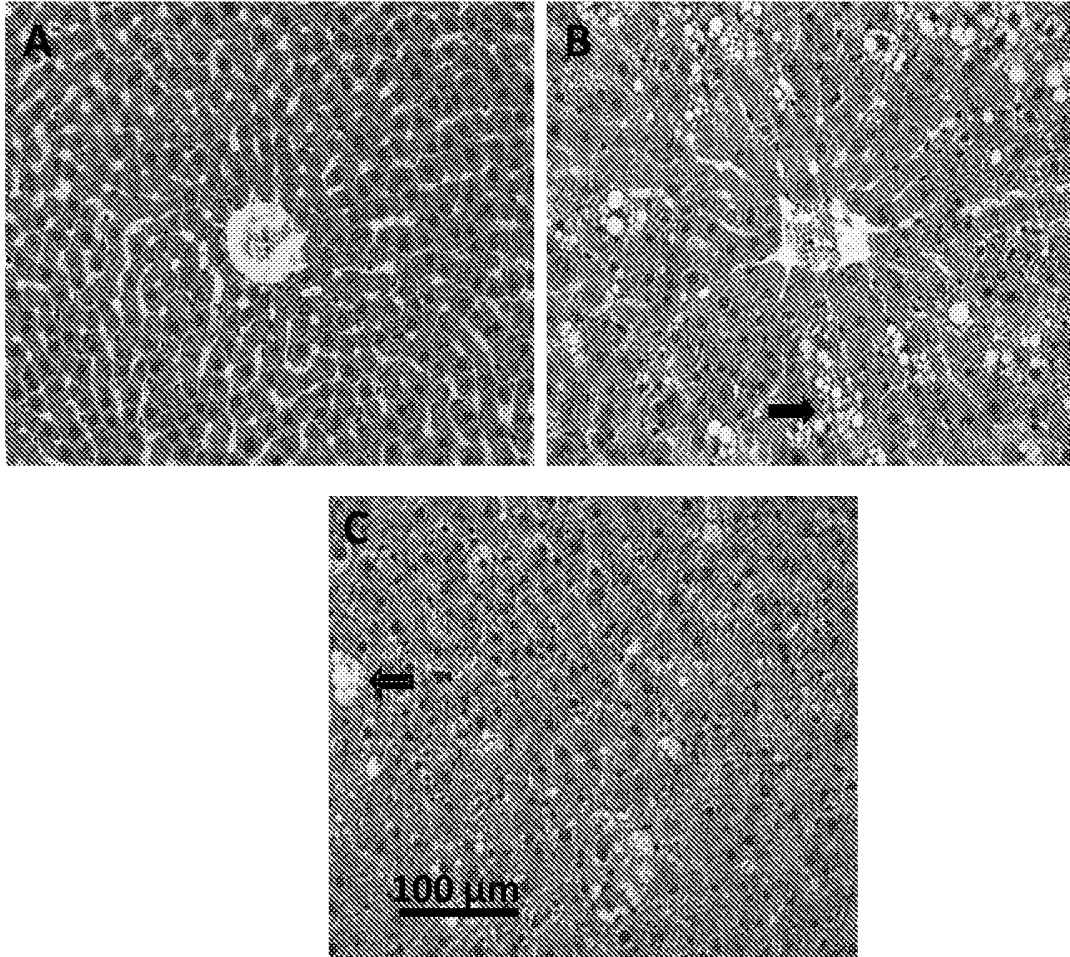


FIG 4

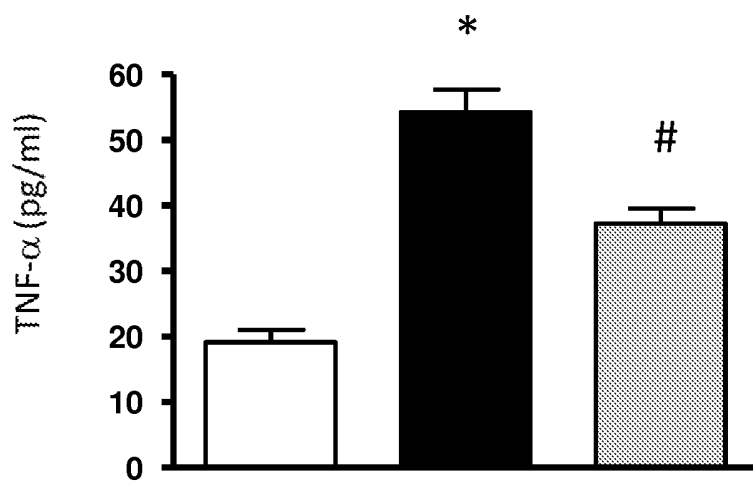


FIG 5

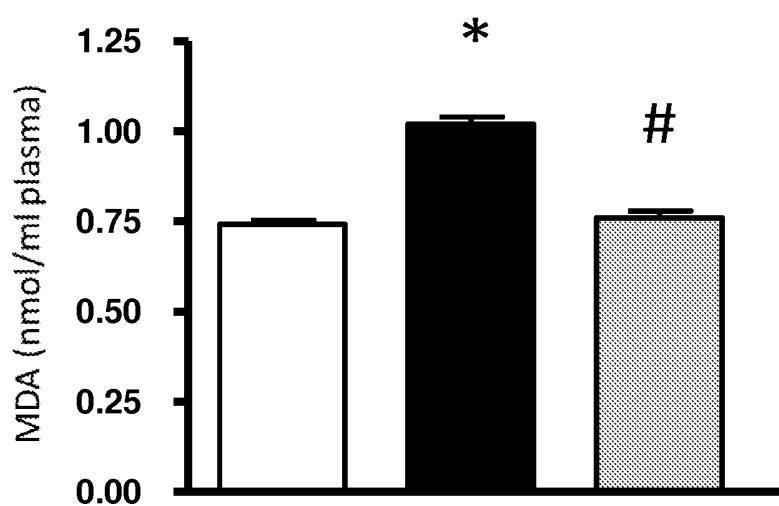


FIG 6

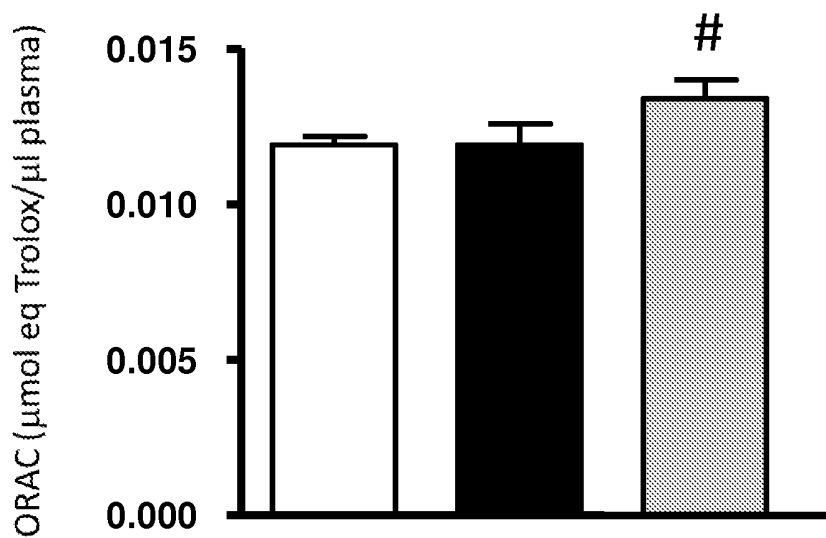


FIG 7

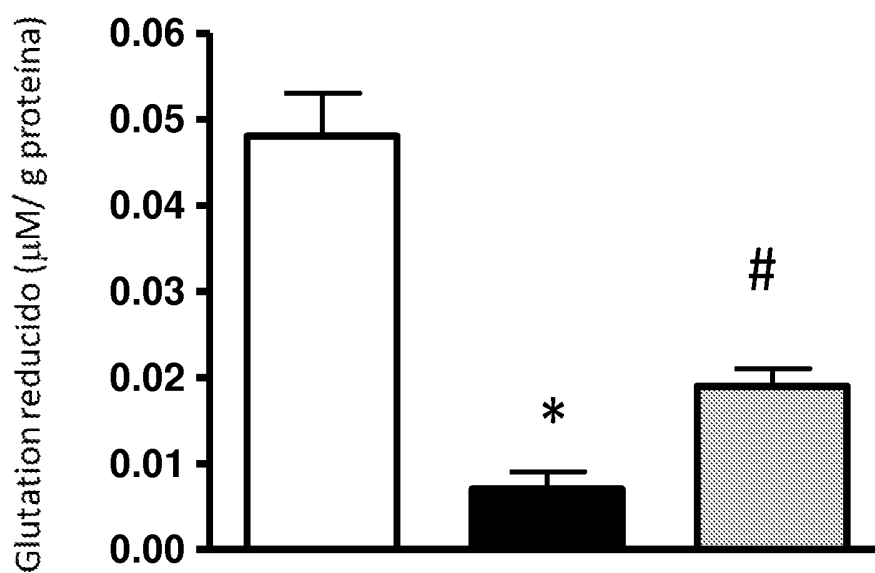
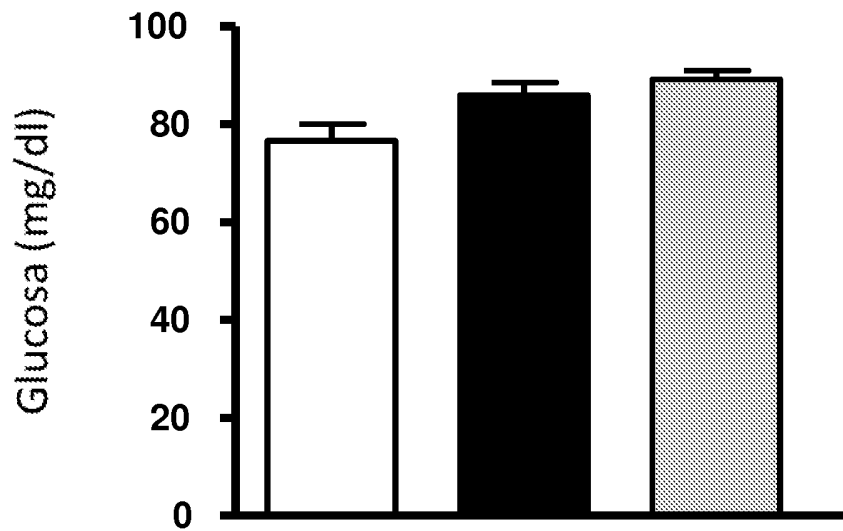


FIG 8

A



B

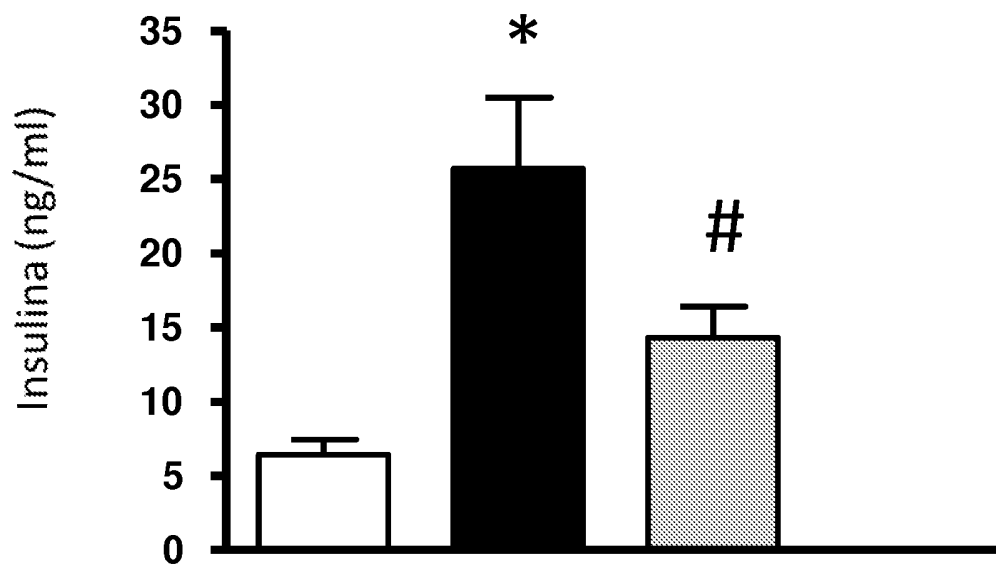


FIG 9

