

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
11 de Octubre de 2007 (11.10.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2007/113368 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:  
A61K 38/55 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2007/070071
- (22) Fecha de presentación internacional:  
9 de Abril de 2007 (09.04.2007)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
P200600880 5 de Abril de 2006 (05.04.2006) ES
- (71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD DE VALENCIA** [ES/ES]; Avda. Blasco Ibañez, 13, E-46010 Valencia (ES). **FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN HOSPITAL LA FE** [ES/ES]; Avda. Campanar, 21 Escuela de Enfermería 6ª planta, Despacho 619, E-46009 Valencia (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **MANZANARES MIR, Paloma** [ES/ES]; Insto. de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Apartado 73, E-46100 Burjassot (valencia) (ES). **MARCOS LÓPEZ, José Francisco** [ES/ES]; Insto. de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Apartado 73, E-46100 Burjassot (valencia) (ES). **ENRIQUE LÓPEZ, María** [ES/ES]; Insto. de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior

de Investigaciones Científicas, Apartado 73, E-46100 Burjassot (valencia) (ES). **VALLÉS ALVENTOSA, Salvador** [ES/ES]; Insto. de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Apartado 73, E-46100 Burjassot (valencia) (ES). **CENTENO GUIL, José María** [ES/ES]; Universidad de Valencia, Avda. de Blasco Ibañez, 13, E-46100 Valencia (ES). **SALOM SANVALERO, Juan Bautista** [ES/ES]; Fundación Para La Investigación Del Hospital La Fe, Avda. Campanar, 21, Escuela de Enfermería, 6ª Planta, Despacho 619, E-46009 Valencia (ES). **TORREGROSA BERNABE, Germán** [ES/ES]; Fundación Para La Investigación Del Hospital La Fe, Avda. Campanar, 21, Escuela de Enfermería, 6ª Planta, Despacho 619, E-46009 Valencia (ES). **ALBORCH DOMÍNGUEZ, Enrique** [ES/ES]; Fundación Para La Investigación Del Hospital La Fe, Avda. Campanar, 21, Escuela de Enfermería, 6ª Planta, Despacho 619, E-46009 Valencia (ES).

- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: USE OF HEXAPEPTIDES FOR PREPARING ANGIOTENSIN 1 CONVERTING ENZYME MEDICINAL PRODUCTS

(54) Título: USO DE HEXAPÉPTIDOS PARA PREPARAR MEDICAMENTOS DE LA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I

(57) Abstract: The invention consists in using synthetic hexapeptides as bioactive products. These are peptides with six amino acid residues as effective inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE). The peptides that are the subject of the patent may be obtained chemically or biotechnologically. Of special interest are those synthesized exclusively from the D-stereoisomers of natural amino acids since this method affords greater stability in addition to their *in vitro* and/or *ex vivo* angiotensin converting enzyme inhibitory activity measured as the reduction in the contraction of rabbit carotid arteries induced by exposure to angiotensin I. These nutraceutical products, possibly in the form of bioactive peptides, are useful both in the food industry and in the pharmaceutical industry.

(57) Resumen: La invención consiste en la utilización de hexapéptidos sintéticos como productos bioactivos. Se trata de un péptido de seis residuos de aminoácidos como inhibidores efectivos de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). Los péptidos objeto de la patente se pueden obtener químicamente, biotecnológicamente. Son de especial interés los sintetizados exclusivamente a partir de los estereoisómeros D- de los aminoácidos naturales ya que así se consigue más estabilidad además de su actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina *in vitro* y/o *ex vivo*, medida como la disminución de la contracción de arterias carótidas de conejo inducida por exposición a angiotensina I. Estos productos nutraceuticos, ya sea como péptido bioactivos, son tanto útiles para la industria alimentaria como para la farmacéutica.



WO 2007/113368 A1



UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

- con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición
- la fecha de presentación de la solicitud internacional está dentro del plazo de dos meses a partir de la fecha de expiración del periodo de prioridad

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

## Título

Uso de hexapéptidos para preparar medicamentos de la enzima convertora de angiotensina I

### 5 Sector de la Técnica

Control de la hipertensión; Industria agroalimentaria; Ingredientes bioactivos; Farmacología; Alimentos funcionales

### Estado de la Técnica

10 La hipertensión, que consiste en un aumento de la presión sanguínea superior a la deseable para la salud, es un problema sanitario bastante serio ya que está relacionada con un alto riesgo de complicaciones cardio- y cerebrovasculares. El accidente cerebrovascular agudo, también denominado *ictus*, constituye, después de las enfermedades isquémicas cardíacas y del cáncer, la  
15 tercera causa de mortalidad y la primera de discapacidad permanente en las sociedades occidentales avanzadas. La mayoría de accidentes cerebrovasculares agudos (85%) son de tipo “isquémico”, y tienen su origen en la oclusión aguda por un trombo (“trombosis”) o un émbolo (“embolia”) de una de las principales arterias cerebrales, lo que origina un descenso en la  
20 perfusión sanguínea (“isquemia”) y consiguiente necrosis (“infarto”) de la región cerebral irrigada por dicha arteria. El resto de accidentes cerebrovasculares (15%) son de tipo “hemorrágico”, originados por la rotura de un vaso sanguíneo en el propio parénquima cerebral (“hemorragia intracerebral”) o en la superficie cerebral (“hemorragia subaracnoidea”).

25 De lo dicho anteriormente se desprende que en el desarrollo de estas enfermedades falla la correcta regulación de la presión arterial sistémica, en la que interviene un complejo sistema regulador llamado sistema renina-angiotensina (SRA), y del que forman parte la renina, la enzima convertora de la angiotensina (ECA), la aldosterona, y las angiotensinas I y II.

Este SRA es un sistema hormonal circulante, y concretamente la renina y la ECA son dos peptidasas que forman parte del mismo y que actúan secuencialmente sobre una serie de pequeños péptidos, reguladores en última instancia de la presión sanguínea. En los seres humanos, la renina se libera en el riñón y la ECA se encuentra presente principalmente en las células endoteliales vasculares, en los pulmones, en los riñones y en el cerebro.

Este sistema renina-angiotensina se activa en determinadas situaciones mediante la actuación de la renina sobre un péptido precursor denominado angiotensinógeno (de procedencia hepática), el cual se convierte en el decapeptido angiotensina I. Esta angiotensina I, inactiva desde el punto de vista biológico, se transforma a su vez por acción de la ECA en angiotensina II al separarse el dipéptido a partir de su extremo C-terminal. La angiotensina II generada es un potente vasoconstrictor que ejerce su acción tras la unión a sus receptores específicos denominados "receptores AT<sub>1</sub>". Dicha acción se traduce en la contracción de los vasos sanguíneos que como consecuencia produce un aumento de la presión sanguínea. Además de contribuir a la formación de la angiotensina II, la ECA también actúa sobre otro péptido circulante, el nonapéptido llamado bradiquinina, potente agente vasodilatador que pierde esta característica al ser hidrolizado.

Por todo lo expuesto anteriormente, la interferencia farmacológica con el SRA podría tener efectos beneficiosos en el tratamiento de los desórdenes vasculares asociados con la hipertensión. La inhibición de la actividad ECA permitiría disminuir la formación de angiotensina II además de reducir la pérdida de funcionalidad de la bradiquinina, evitando de esta manera la acción vasoconstrictora de la primera y potenciando la acción vasodilatadora de la segunda. A este respecto se ha puesto de manifiesto en numerosos estudios la eficacia de los inhibidores de ECA reduciendo la morbilidad y la mortalidad en pacientes con fallo cardíaco, síndrome cardio-metabólico y diabetes.

A pesar de su demostrada eficacia en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares asociadas a la hipertensión, los fármacos inhibidores del ECA disponibles en la actualidad no pueden considerarse la

opción definitiva. Por su falta de especificidad estos fármacos no son bien tolerados por algunos pacientes en los que se presentan efectos secundarios indeseables como tos seca y angioedema; además, no bloquean completamente la síntesis de angiotensina II ya que ésta sigue otras vías de síntesis que no dependen del ECA. Es necesario, por lo tanto, encontrar nuevos inhibidores del ECA con mayor especificidad y que puedan ser co-administrados con otros fármacos, como por ejemplo los "bloqueadores del receptor de angiotensina", para el tratamiento óptimo de los desórdenes vasculares de origen hipertensivo ligados al SRA a la vez que se minimizan los efectos secundarios antes citados. Incluso y según las características de los inhibidores seleccionados, podría conseguirse una aproximación más natural del tratamiento al añadir dichos inhibidores a los alimentos, lo cual produciría un efecto positivo tanto sobre dicho tratamiento como sobre la prevención de los síntomas inherentes a la hipertensión.

Hasta la fecha se han publicado numerosos trabajos bibliográficos relacionados con la inhibición de ECA mediante el empleo de pequeños péptidos sintéticos como principales responsables de dicha inhibición. Estos péptidos presentan una gran variabilidad pues tienen diferentes longitudes y estructuralmente difieren en las secuencias de los aminoácidos que los constituyen [Patchett, A.A., Harris, E., Tristram, E.W., Wyratt, M.J., Wu, M.T., Taub, D., Peterson, E.R., Ikeler, T.J., Broeke, J.Ten., Payne, L.G., Ondeyka, D.L., Thorsett, E.D., Greenlee, W.J., Lohr, N.S., Hoffsommer, R.D., Joshua, H., Ruyle, W.V., Rothrock, J.W., Aster, S.D., Maycock, A.L., Robinson, F.M., Hirschmann, R., Sweet, C.S., Ulm, E.H., Gross, D.M., Vassil, T.C. y Stone, C.A. (1980). A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nature* 288, 280-283; Ondetti, M.A., Rubin, B. y Cushman, D.W. (1977). Design of specific Inhibitors of angiotensin-converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science* 196, 441-444; Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F. y Ondetti, M.A. (1977). Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry* 16 (25), 5484-5491; Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F. y Ondetti, M.A. (1981). Angiotensin converting enzyme inhibitors. evolution

of a new class of antihypertensive drugs. En: Angiotensin converting enzyme inhibitors. Mechanisms of action and clinical implications. Section I, pp3-25. Ed. Horovitz, Z.P., Urban & Schwarzenberg (Baltimor-Munich); Edling, O., Bao, G., Feelisch, M., Unger, T. y Gohlke, P. (1995). Moexipril, a new angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor: Pharmacological characterization and comparison with enalapril. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 275 (2), 854-863; Gómez-Ruiz, J.A., Recio, I. y Belloque, J. (2004). ACE-Inhibitory activity and structural properties of peptide Asp-Lys-Ile-His-Pro [ $\beta$ -CN f(47-51)]. Study of the peptide forms synthesized by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (20), 6315-6319; Cotton, J., Hayashi, M.A.F., Cuniasse, P., Vazeux, G., Lanzer, D., De Camargo, A.C.M. y Dive, V. (2002). Selective inhibition of the c-domain of angiotensin i converting enzyme by bradykinin potentiating peptides. *Biochemistry* 41 (19), 6065-6071; Lau, C-P., Tse, H-F., Ng, W., Chan, K-K., Li, S-K., Keung, K-K., Lau, Y-K., Chen, W-H., Tang, Y-W. y Leung, S-K. (2002). Comparison of Perindopril Versus Captopril for Treatment of Acute Myocardial Infarction. *American Journal of Cardiology* 89 (15), 150-154; Smith, A.I., Lew, R.A., Shrimpton, C.N., Evans, R.G. y Abbenante, G. (2000). A Novel Stable Inhibitor of Endopeptidases EC 3.4.24.15 and 3.4.24.16 Potentiates Bradykinin-Induced Hypotension. *Hypertension* 35, 626-630; Azizi, M., Massien, C., Michaud, A. y Corvol, P. (2000). In vitro and in vivo inhibition of the 2 active sites of ace by omapatrilat, a vasopeptidase inhibitor. *Hypertension* 35, 1226-1231; Hou, W-C., Chen, H-J. y Lin, Y-H. (2004). Antioxidant peptides with angiotensin converting enzyme inhibitory activities and applications for angiotensin converting enzyme purification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (6), 1706-1709].

Así mismo, también se han llevado a cabo estudios con el fin de aislar e identificar inhibidores de carácter natural presentes en los alimentos. En numerosos casos se ha llegado a identificar como responsables ciertos péptidos naturales llegando incluso a la determinación de su secuencia. De esta manera se han podido sintetizar la mayoría de ellos con el fin de confirmar su actividad. Como materia prima, se emplean proteínas tanto de origen animal como vegetal [WO2005012355 Bioactive peptides derived from the proteins of

egg white by means of enzymatic hydrolysis; Li, G-H., Le, G-W., Shi, Y-H. y Shrestha S. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research* 24, 469-486; Pripp, A.H., Isaksson, T., Stepaniak, L. y Sorhaug, T. (2004). Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *European Food Research and Technology*. 219, 579-583; Robert, M-C., Razaname, A., Mutter, M. y Juillerat, M.A. (2004). Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 10 2765. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (23), 6923-6931; Chen, T-L., Lo, Y-C., Hu, W-T., Wu, M-C., Chen, S-T. y Chang, H-M. (2003). Microencapsulation and Modification of synthetic peptides of food proteins reduces the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (6), 1671-1675; Fujita, H. y Yoshikawa, M. 15 (1999). LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology* 44, 123-127; Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and Ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science & Technology* 11, 347-356; Suetsuna, K. y Nakano, T. (2000). Identification of an antihypertensive peptide from peptic 20 digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). *Journal of Nutritional Biochemistry* 11, 450-454; Yokoyama, K., Chiba, H. y Yoshikawa, M. (1992). Peptide inhibitors for angiotensin i-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56 (10), 1541-1545; Yano, S., Suzuki, K. y Funatsu, G. (1996). Isolation from  $\alpha$ -zein of thermolysin peptides 25 with angiotensin i-converting enzyme inhibitory activity. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 60 (4), 661-663; Wako, Y., Ishikawa, S. y Muramoto, K. (1996). Angiotensin I-converting enzyme inhibitors in autolysates of squid liver and mantle muscle. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 60 (8), 1353-1355; Suetsuna, K. (1998). Isolation and characterization of 30 angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic). *Journal of Nutritional Biochemistry* 9, 415-419; Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T. y Coronen, H. (1998). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*

8, 325-331; Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Teramoto, T., Okabe, M. y Mimura, T. (1988). Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 155 (1), 332-337. Maruyama, S., Miyoshi, S. y Tanaka, H. (1989). Angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from *Ficus carica*. *Agricultural and Biological Chemistry* 53 (10), 2763-2767; Ariyoshi, Y. (1993). Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends in Food Science & Technology* 4, 139-144; Takayanagi, T. y Yokotsuka, K. (1999). Angiotensin I converting enzyme-inhibitory peptides from wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 50 (1), 65-68; Fuglsang, A., Nilsson, D. y Nyborg, N.C.B. (2003). Characterization of new milk-derived inhibitors of angiotensin converting enzyme *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry* 18 (5), 407-412 ].

15           En la presente invención se describe la secuencia de aminoácidos de otros péptidos, distinta a la de los mencionados anteriormente, caracterizados por tener actividad inhibidora de la ECA. Dicha inhibición de la actividad ECA se manifiesta en ensayos realizados *in vitro*, midiendo la inhibición de la conversión de sustratos artificiales (Hipuril-Histidil-Leucina) y naturales  
20 (Angiotensina I) mediada por ECA, y en ensayos realizados *ex vivo*, midiendo la disminución de la contracción de arterias basílicas ó carótidas de conejo inducida por exposición a Angiotensina I.

### **Breve descripción de la invención**

25           La presente invención está relacionada con los sectores farmacológico y de la industria agroalimentaria y consiste en la identificación y caracterización de unos determinados péptidos (llamados PIECA, Péptidos Inhibidores de la Enzima Conversora de Angiotensina) como inhibidores efectivos de la Enzima Conversora de la Angiotensina (ECA) que se halla implicada en la formación  
30 del compuesto Angiotensina II que es un vasoconstrictor responsable, entre otras causas/mecanismos, de la hipertensión. Las secuencias de residuos de



aminoácidos de los péptidos identificados son las siguientes, desde el extremo amino terminal al extremo carboxi terminal: (péptido PIECA32; SEQ ID NO 1) y (péptido PIECA34, SEQ ID NO 2) que se hayan descritos en la solicitud de patente ES200001973 como PAF32 y PAF34 respectivamente. La actividad inhibidora de los péptidos se manifiesta por una reducción de la actividad ECA determinada en ensayos *in vitro*, así como por una reducción de la contracción ECA dependiente *ex vivo* empleando segmentos de arterias. Se demuestra que la actividad inhibidora de los péptidos se corresponde con una secuencia de aminoácidos característica, ya que otros péptidos relacionados con los anteriores y con una secuencia de residuos de aminoácidos parecida, pero no idéntica, no presentan dicha actividad. Se describe la potencial utilización de los péptidos inhibidores de ECA como compuestos bioactivos para el control de la hipertensión. En un ejemplo particular, se describe la actividad inhibidora de ECA de dichos péptidos cuando se emplean como sustratos Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) y Angiotensina I. La actividad inhibidora se ha demostrado en condiciones *in vitro* empleando ECA purificada a partir de riñón de cerdo y *ex vivo* empleando segmentos de arterias carótida y basilar de conejo.

### Descripción detallada de la invención

En la presente invención se describe la identificación y caracterización de nuevos péptidos con actividad de inhibición de la Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), implicada en los mecanismos de control de la presión arterial. En un ejemplo particular, se describe la utilización de dichos péptidos como inhibidores de ECA mediante el empleo de sustratos artificiales como el Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) ó naturales como la Angiotensina I, así como su efecto inhibidor sobre la contracción ECA-dependiente de segmentos de arterias de conejo.

Los inhibidores descritos en la presente invención son péptidos con una secuencia de seis aminoácidos característica SEQ ID NO 1 (péptido PIECA32) y SEQ ID NO 2 (péptido PIECA34), Figura 1, y distinta de los péptidos inhibidores de ECA conocidos anteriormente [Guan-Hong Li, Guo-Wei Le, Yong-Hui Shi y Sundar Shrestha (2004). Angiotensin I-converting enzyme

inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research* **24**, 469-486; Dziuba, J., Minkiewicz, P., Nalecz, D. y Iwaniak, A. (1999). Database of biologically active peptide sequences. *Nahrung* **43**, 190-195; Fujita, H., Yokoyama, K. y Yoshikawa, M. Classification and Antihypertensive Activity of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Food Proteins. *Journal of Food Science* **65**, 564-569; Reed, J. D., Edwards, D. L., y Gonzalez, C. F. (1997)]. En un ejemplo particular de realización de la invención, dichos hexapéptidos se sintetizaron químicamente con los estereoisómeros L-naturales de los aminoácidos (PIECA32L y PIECA34L) y seguidamente se purificaron, siguiendo procedimientos habituales para toda aquella persona experta en el área de conocimiento de la presente invención [Fields, G. B. y Noble, R. L. (1990). Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International Journal of Peptide and Protein Research* **34**, 161-214]. Para todo aquel experto en el tema, es conocido que las actividades biológicas de pequeños péptidos sintetizados con L-aminoácidos son también compartidas por los péptidos de la misma secuencia de aminoácidos contruidos con los estereoisómeros D- de los aminoácidos constituyentes [Blondelle, S. E., Houghten, R. A., y Pérez-Payá, E. (1998b). Peptide inhibitors of calmodulin. *United States Patent Number* 5840697; Edwards, D. L. (1997). Synthetic Antibiotics. *United States Patent Number* 5602097]. Con los mismos procedimientos conocidos citados anteriormente, dichos péptidos PIECA se sintetizaron y purificaron utilizando los estereoisómeros D- de los aminoácidos constituyentes (PIECA32D y PIECA34D), que no son naturales pero tienen la propiedad de conferir a los péptidos resultantes mayor estabilidad y resistencia a la degradación por proteasas presentes en los fluidos biológicos.

En la presente invención se describen ensayos experimentales que ilustran la actividad de los dos estereoisómeros de SEQ ID NO 1 PIECA32L y PIECA32D y de SEQ ID NO 2 PIECA34L, y PIECA34D, en condiciones experimentales *in vitro*, utilizando ECA purificada de riñón de cerdo y tres sustratos distintos, uno artificial denominado HHL y dos naturales como son la Angiotensina I y la Bradiquinina. El primero de los sustratos permite llevar a

cabo una serie de ensayos encaminados a conocer la capacidad inhibidora de los péptidos, mientras que el uso de los dos últimos permite contrastar los resultados obtenidos con el anterior y además comprobar dicha capacidad inhibidora de ECA en el caso de utilizar sustratos naturales.

5           La actividad inhibidora de los péptidos PIECA descritos en la presente invención se manifiesta con una reducción de la actividad de la ECA al llevar a cabo los ensayos *in vitro* en las condiciones establecidas, como queda demostrado mediante los ensayos experimentales descritos en la presente invención. Estos ensayos también demuestran que los PIECA tienen una  
10           secuencia de aminoácidos característica y específica, ya que péptidos relacionados de secuencia parecida -pero no idéntica- a PIECA32L, PIECA34L, PIECA32D y PIECA34D no presentan la mencionada actividad inhibidora.

          La actividad inhibidora de los péptidos PIECA descritos en la presente invención también se manifiesta con una reducción de la contracción ECA-  
15           dependiente de arterias de conejo, carótida y basilar, inducida mediante la adición de Angiotensina I en ensayos *ex vivo*.

          Considerando las propiedades de los PIECA descritos en la presente invención, es obvio para todo aquel experto en el tema su potencial utilización como aditivos alimentarios, compuestos ó fármacos de utilidad en la prevención  
20           ó tratamiento de enfermedades que tengan como causa ó sintomatología la hipertensión arterial.

          Es obvio para todo aquel experto en el área de la presente invención el interés, diseño y desarrollo de estrategias derivadas de la biotecnología, que incluyen la metodología del ADN recombinante y de la transformación genética  
25           de organismos, que pueden ser utilizadas para la producción y utilización de los PIECA32L y PIECA34L descritos en la presente invención y sus derivados para los fines descritos. En un ejemplo de realización de la invención se explica la producción a gran escala de los péptidos mediada por organismos transformados genéticamente.

### Descripción de los dibujos

- Figura 1.** Secuencia de aminoácidos de los hexapéptidos SEQ ID NO 1 con sus correspondientes estereoisómeros PIECA32D, PIECA32L, y SEQ ID NO 2 con sus estereoisómeros PIECA34D, PIECA34L (descritos como inhibidores de ECA en la presente invención) y de P26D SEQ ID NO 3 y P36D SEQ ID NO 4 (utilizados como controles negativos en los ensayos descritos). Las secuencias están escritas desde el extremo amino terminal (a la izquierda) al extremo carboxi terminal (a la derecha). Los péptidos se encuentran acetilados en su extremo amino terminal (Ac-) y amidados en su extremo carboxi terminal (Am-).
- Figura 2.** Efecto de la concentración de PIECA32L sobre la actividad de la Enzima Conversora de Angiotensina I.
- Figura 3.** Efecto de la concentración de PIECA34L sobre la actividad de la Enzima Conversora de Angiotensina I.

### Un ejemplo de realización de la invención.

- 1. Síntesis de péptidos.** Los péptidos caracterizados y analizados en la presente invención (Figura 1: P26D SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 1 con sus estereoisómeros PIECA32D, PIECA32L, SEQ ID NO 2 con sus estereoisómeros PIECA34D, PIECA34L y P36D SEQ ID NO 4) se sintetizaron químicamente sobre fase sólida siguiendo procedimientos habituales que utilizan el grupo N-(9-fluorenyl) methoxycarbonyl (Fmoc) para la protección del grupo  $\alpha$ -amino de los aminoácidos constituyentes [Fields, G. B. y Noble, R. L. (1990). Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *International Journal of Peptide and Protein Research* **34**, 161-214]. Los péptidos P26D y P36D se diseñaron como control negativo en los ensayos descritos a continuación. El extremo N-terminal de los péptidos se encuentra acetilado (Ac) y el extremo C-terminal amidado ( $\text{NH}_2$ ), como consecuencia del procedimiento de síntesis. Después de la síntesis, los

péptidos se purificaron mediante RP-HPLC (del inglés, *reversed phase- high performance liquid chromatography*, cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa) y su identidad se confirmó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (del inglés, *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*). Todos estos procedimientos son habituales para toda aquella persona experta en el área de conocimiento de la presente invención.

También es posible la producción de los péptidos L compuestos por aminoácidos naturales (estereoisómeros L-) descritos en la presente invención mediante estrategias derivadas de la biotecnología. Es obvio, para toda aquella persona experta en el área de conocimiento, que la producción de los péptidos mediante procedimientos biotecnológicos, que incluyen las metodologías del ADN recombinante y de la transformación genética de organismos, supondría una mejora en los costes de producción, y que por tanto dicha producción es un aspecto importante en el contexto de la aplicabilidad industrial de la presente invención. En el supuesto de la producción mediante biotecnología, la secuencia del péptido producido por un organismo modificado genéticamente sería codificada por un fragmento de ADN de acuerdo a las leyes del código genético [Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.], Todos estos procedimientos son habituales para toda aquella persona experta en el área de conocimiento de la presente invención.

**2. Ensayos *in vitro* de inhibición de la actividad ECA sobre el sustrato artificial HHL.** En estos ensayos, la capacidad inhibidora de los péptidos se determinó midiendo por HPLC (del inglés *high performance liquid chromatography*) el ácido hipúrico resultante de la hidrólisis del sustrato artificial HHL (Hipuril-Histidil-Leucina) basándose en el método propuesto en la literatura [Wu, J., Aluko, R.E. y Muir, A.D. (2002). Improved method for direct high performance liquid-chromatography assay of ACE catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A* 950, 125-130]. La mezcla de reacción tiene un volumen de 225  $\mu$ l y está constituida por 50  $\mu$ l de HHL 25 mM en tampón Tris HCl 200 mM pH 8.3 con NaCl 600 mM y ZnCl<sub>2</sub> 10  $\mu$ M,

75 µl de una solución de ACE en el mismo tampón que corresponden a 1.5 mU de actividad, y 100 µl de péptido (disuelto en tampón MOPS 10 mM pH 7) a diferentes concentraciones según la concentración final deseada en el ensayo. El enzima y el inhibidor se preincuban durante 15 minutos a 37°C y a continuación se añade el sustrato incubándose el conjunto 30 minutos a dicha temperatura. La reacción se detiene añadiendo 25 µl de HCl 6M. Para la determinación cromatográfica del ácido hipúrico liberado se utiliza una columna de fase inversa C18, la elución se lleva a cabo empleando un gradiente de acetonitrilo en agua con TFA 0.05% y se determina el ácido hipúrico midiendo la absorbancia a 228 nm. Los resultados aparecen en la Tabla 1 pudiéndose observar una inhibición significativa para los péptidos PIECA 32 SEQ ID NO 1 y PIECA 34 SEQ ID NO 2, siendo mayor la inhibición para los PIECA 32 tanto L como D. Los P 26D SEQ ID NO 3 y P 36D SEQ ID NO 4 no mostraron una inhibición significativa.

**3. Ensayos *in vitro* de inhibición de la actividad ECA sobre el sustrato natural Angiotensina I.** El protocolo experimental descrito en el apartado 2 se repitió empleando como sustrato la Angiotensina I (cantidad final en el ensayo 20µg). La determinación del producto de reacción resultante, Angiotensina II, se llevó a cabo cromatográficamente utilizando una columna de fase inversa C18, un gradiente de acetonitrilo en agua con TFA 0.1% y midiendo la absorbancia a 214 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2 y ponen de manifiesto una mayor inhibición en el caso de los péptidos con configuración L, tanto SEQ ID NO 1, PIECA32 como SEQ ID NO 2 PIECA34.

Con este sustrato natural los péptidos con configuración D tienen una capacidad inhibitoria inferior a la conseguida con HHL.

**4. Ensayos *in vitro* de inhibición de la actividad ECA sobre el sustrato natural Angiotensina I para el cálculo del IC<sub>50</sub>.** El protocolo experimental descrito en el apartado anterior se repitió empleando diferentes concentraciones de péptido: 0, 0.5, 2.5, 4, 5, 6, 10, 20, 40, 50 y 80 µM para los ensayos con SEQ ID NO 2 PIECA34L y 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, y 80 µM para SEQ ID NO 1 PIECA32L. En cada caso se efectuaron siete series de

experimentos completos con todas las concentraciones, calculando para cada una de ellas la media y su desviación. La representación gráfica del valor medio correspondiente a la actividad residual para cada una de las concentraciones de péptidos ensayada se muestran en las figuras 2 y 3.

5       A partir de estos resultados se calcularon los IC<sub>50</sub> para SEQ ID NO 1 PIECA 32L y SEQ ID NO 2 PIECA 34L siendo estos de 10.7 y 8.1 µM respectivamente.

10       **5. Ensayos *in vitro* de inhibición de la actividad ECA sobre el sustrato natural Bradiquidina.** El protocolo experimental descrito en el apartado 3 se repitió utilizando como sustrato la Bradiquinina. Se empleó la misma cantidad de sustrato, 20 µg en el ensayo y se detectó como producto final el fragmento de Bradiquinina 1-5. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3 y ponen de manifiesto que no existe inhibición por parte de ninguno de los péptidos SEQ ID NO 1 PIECA32 y SEQ ID NO 2 PIECA34 ensayados.

15       **6. Ensayos *ex vivo* de inhibición de la contracción de arterias aisladas.** La preparación experimental consistió en obtener segmentos cilíndricos (3 mm) de arterias aisladas (arterias basilar y carótida de conejo blanco New Zealand), los cuales se dispusieron en un baño de órganos diseñado para registrar los cambios de tensión isométrica en la pared vascular. El medio (solución Ringer-Locke) en el que se hallan inmersos los segmentos arteriales se mantiene termostatzado a 37°C y continuamente burbujeado con una mezcla gaseosa de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> que le confiere un pH de 7.3-7.4. Los experimentos comienzan tras un periodo de 30-60 min necesario para alcanzar la estabilización en el tono pasivo de 0.5 g para la arteria basilar y de 2 g para la carótida. Tras comprobar la viabilidad de los segmentos arteriales mediante contracción con una solución despolarizante (Ringer-Locke 50 mM KCl), cada segmento arterial se somete a una primera contracción ECA-dependiente con Angiotensina I (1 µM). Tras preincubar los segmentos durante 20 minutos con alguno de los péptidos objeto de estudio (SEQ ID NO 1, PIECA32D y PIECA32L, SEQ ID NO 2, PIECA34D, y PIECA34L a 20 µM de concentración), se indujo una segunda contracción

con Angiotensina I. Como control, se dejaron algunos segmentos sin preincubar con PIECA. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4 y ponen de manifiesto efectos inhibitorios significativos en los casos de SEQ ID NO 1 PIECA32D y PIECA32L sobre arteria carótida.



**Tabla 1.**

Efecto de los péptidos descritos en la presente invención como inhibidores de la Enzima Convertora de la Angiotensina I (SEQ ID NO 1 con sus estereoisómeros PIECA32D, PIECA32L y SEQ ID NO 2 con sus estereoisómeros PIECA34D y PIECA34L) y de los usados como control negativo (SEQ ID NO 4 P36D y P26D SEQ ID NO 3) sobre la actividad ECA, cuando esta enzima actúa sobre el sustrato artificial Hipuril-Histidin-Leucina. Se indican los porcentajes de actividad de la ECA para una concentración de péptido en el ensayo de 20  $\mu$ M, expresándose estos valores como la media  $\pm$  desviación estándar de un número de repeticiones (n).

Péptido	Actividad (%)
P26D SEQ ID NO 3	100 $\pm$ 6 (4)
P36D SEQ ID NO 4	97 $\pm$ 4 (7)
PIECA32D SEQ ID NO 1	52 $\pm$ 13 (4)
PIECA32L SEQ ID NO 1	58 $\pm$ 15 (5)
PIECA34D SEQ ID NO 2	68 $\pm$ 12 (4)
PIECA34L SEQ ID NO 2	74 $\pm$ 8 (6)

**Tabla 2.**

Efecto inhibitor de los péptidos descritos en la presente invención (SEQ ID NO 1 con sus estereoisómeros PIECA32D, PIECA32L y SEQ ID NO 2 con sus estereoisómeros PIECA34D y PIECA34L) y del P36D SEQ ID NO 4 usado como control negativo sobre la actividad ECA, cuando esta enzima actúa sobre la Angiotensina I. Se indican los porcentajes de actividad de la ECA para una concentración de péptido en el ensayo de 20  $\mu$ M, expresándose estos valores como la media  $\pm$  desviación estándar de un número de repeticiones (n).

Péptido	Actividad (%)
P36D SEQ ID NO 4	88 $\pm$ 10 (5)
PIECA32D SEQ ID NO 1	83 $\pm$ 5 (4)
PIECA32L SEQ ID NO 1	45 $\pm$ 11 (5)
PIECA34D SEQ ID NO 2	85 $\pm$ 4 (3)
PIECA34L SEQ ID NO 2	29 $\pm$ 9 (4)

**Tabla 3.**

Efecto inhibitor de los péptidos descritos en la presente invención (SEQ ID NO 1 con sus estereoisómeros PIECA32D, PIECA32L, SEQ ID NO 2 con sus estereoisómeros PIECA34D y PIECA34L) sobre la actividad ECA, cuando esta enzima actúa sobre el sustrato Bradiquinina. Se indican los porcentajes de actividad de la ECA para una concentración de péptido en el ensayo de 20  $\mu$ M, expresándose estos valores como la media  $\pm$  desviación estándar de un número de repeticiones (n).

Péptido	Actividad (%)
PIECA32D SEQ ID NO 1	88 $\pm$ 11 (3)
PIECA32L SEQ ID NO 1	97 $\pm$ 30 (3)
PIECA34D SEQ ID NO 2	97 $\pm$ 16 (3)
PIECA34L SEQ ID NO 2	100 $\pm$ 13 (3)

**Tabla 4.**

Efecto inhibitor de los péptidos descritos en la presente invención (SEQ ID NO 1 con sus estereoisómeros PIECA32D, PIECA32L, SEQ ID NO 2 con sus estereoisómeros PIECA34D y PIECA34L) sobre la contracción ECA-dependiente con Angiotensina I en arterias aisladas de conejo. Los resultados indican la contracción en respuesta a Angiotensina I (1  $\mu$ M), en % respecto a una respuesta previa en el mismo segmento arterial, y se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de los experimentos realizados en (n) segmentos arteriales.

10

	Arteria Basilar	Arteria Carótida
Control	90 $\pm$ 12 (13)	86 $\pm$ 4 (17)
PIECA 32D SEQ ID NO 1	75 $\pm$ 9 (11)	65 $\pm$ 7 (11) **
PIECA 32L SEQ ID NO 1	63 $\pm$ 6 (12)	55 $\pm$ 4 (12) **
PIECA 34D SEQ ID NO 2	79 $\pm$ 6 (5)	73 $\pm$ 4 (6)
PIECA 34L SEQ ID NO 2	72 $\pm$ 9 (6)	67 $\pm$ 2 (6)

\*\* Significativamente menor respecto a su control, P<0.01.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un hexapéptido bioactivo como inhibidor de la enzima convertora de angiotensina I (ECA) *in vitro* y/o como inhibidores de la vasoconstricción ECA- dependiente *ex vivo*, caracterizado por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2.  
5
2. Uso de un hexapéptido bioactivo como inhibidor de la enzima convertora de angiotensina I (ECA) *in vitro* y/o como inhibidores de la vasoconstricción ECA- dependiente *ex vivo*, caracterizado por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2. porque su secuencia de aminoácidos sólo difiere de SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2 según la reivindicación 1 por cambios conservativos  
10
3. Uso de un hexapéptido bioactivo como inhibidor de la enzima convertora de angiotensina I (ECA) *in vitro* y/o como inhibidores de la vasoconstricción ECA- dependiente *ex vivo*, según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizado por haber sido sintetizado exclusivamente a partir de los estereoisómeros D- de los aminoácidos naturales  
15  
20
4. Uso de un hexapéptido bioactivo como inhibidor de la enzima convertora de angiotensina I (ECA) *in vitro* y/o como inhibidores de la vasoconstricción ECA- dependiente *ex vivo*, según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizado por haber sido sintetizado a partir de una mezcla de aminoácidos naturales (estereoisómeros- L) y de estereoisómeros D- de los aminoácidos naturales  
25
5. Uso de un péptido bioactivo como inhibidor de la enzima convertora de angiotensina I (ECA) *in vitro* y/o como inhibidores de la vasoconstricción ECA- dependiente *ex vivo*, según las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado porque su secuencia de aminoácidos contiene las SEQ ID NO 1 o SEQ ID  
30

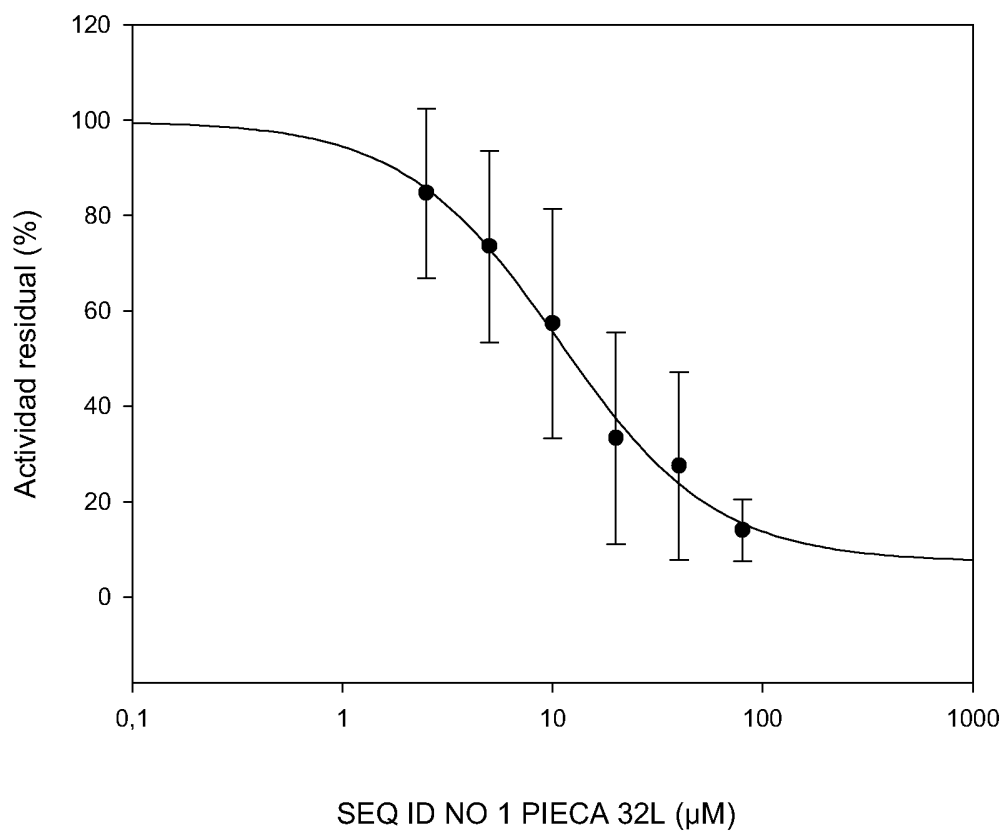
NO 2 según la reivindicación 1 o cambios conservativos en las mismas según las reivindicación 2

- 5 6. Aditivo, ingrediente o suplemento alimentario funcional caracterizada por comprender al menos alguno de los productos bioactivos con actividad IECA *in vitro* y/o como inhibidores de la vasoconstricción ECA- dependiente *ex vivo* indicados en las reivindicaciones 1 a 5
- 10 7. Composición farmacéutica caracterizada por comprender al menos alguno de los productos bioactivos con actividad IECA *in vitro* y/o *ex vivo* indicados en las reivindicaciones 1 a 5
- 15 8. Producto alimentario funcional caracterizada por comprender al menos alguno de los productos bioactivos con actividad IECA *in vitro* y/o como inhibidores de la vasoconstricción ECA- dependiente *ex vivo* indicados en las reivindicaciones 1 a 5
- 20 9. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 7 en la elaboración de un medicamento indicado contra la hipertensión.
10. Uso de aditivo, ingrediente, alimentario funcional según la reivindicación 6 en la elaboración de un producto alimentario funcional favorable para reducir la hipertensión.

1/3

	1	2	3	4	5	6	
SEQ ID NO 1 PIECA32L	Ac-	{arg}	{lys}	{trp}	{his}	{phe}	{leu}-Am
SEQ ID NO 1 PIECA32D	Ac-	{D-arg}	{D-lys}	{D-trp}	{D-his}	{D-phe}	{D-leu}-Am
SEQ ID NO 2 PIECA34L	Ac-	{arg}	{lys}	{trp}	{leu}	{phe}	{leu}-Am
SEQ ID NO 2 PIECA34D	Ac-	{D-arg}	{D-lys}	{D-trp}	{D-leu}	{D-phe}	{D-leu}-Am
SEQ ID NO 3 P26D	Ac-	{arg}	{lys}	{lys}	{trp}	{phe}	{leu}-Am
SEQ ID NO 4 P36D	Ac-	{arg}	{lys}	{trp}	{arg}	{phe}	{leu}-Am

**Figura 1**



**Figura 2**



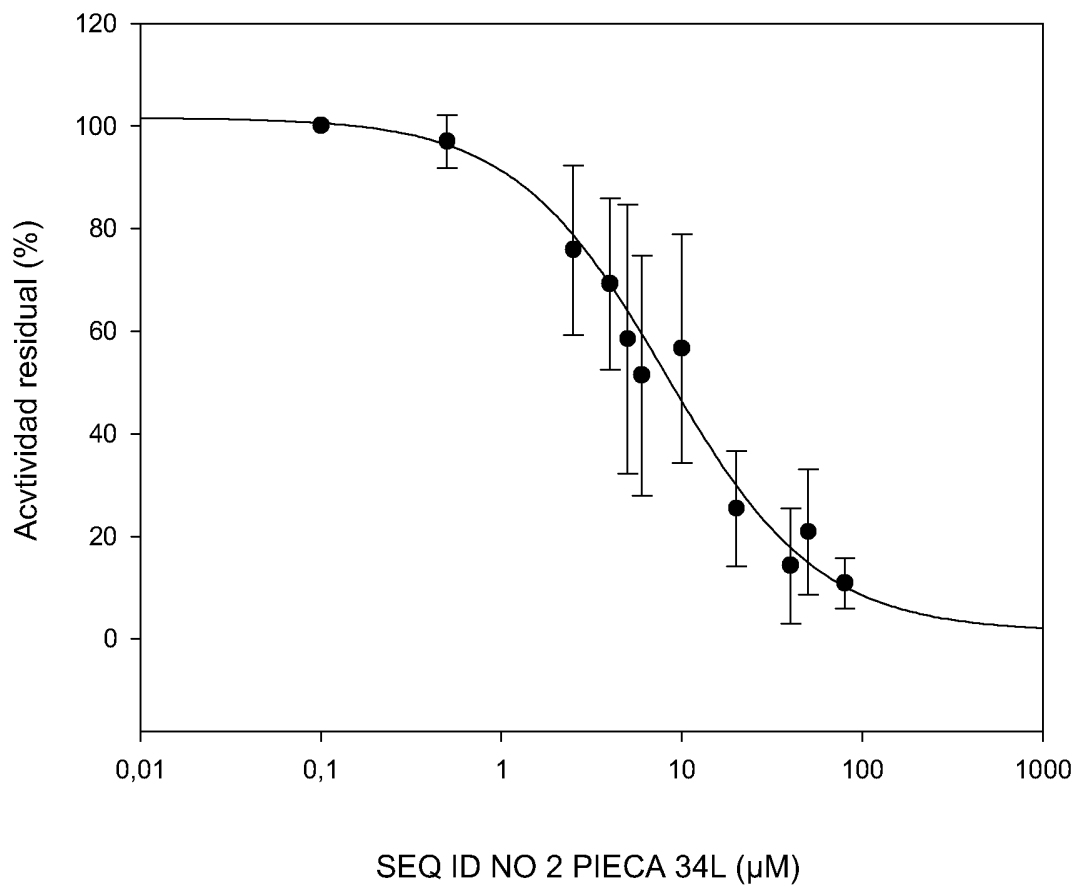


Figura 3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2007/070071

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ES 2191516 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 01.09.2003, the whole document.	7
A	MIGUEL, M. et al. "Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis". JOURNAL OF FOOD PROTECTION. 2004, Vol. 67, N° 9, pages 1914-1920; the whole document.	1-9
PX	CENTENO, J.M. et al. "Lactoferricin-related peptides with inhibitory effects on ACE-dependent vasoconstriction". JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. 26.07.2006. Vol. 54, n° 15, pages 5323-5329; the whole document.	1-9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 July 2007 (30.07.2007)

Date of mailing of the international search report

(10/08/2007)

Name and mailing address of the ISA/  
O.E.P.M.Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M. Novoa Sanjurjo

Telephone No. +34 91 349 84 66

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2007/070071

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2191516 6 A B	01.09.2003	NONE	-----
-----			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2007/070071

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*A61K 38/55* (2006.01)

*A61P 9/12* (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ ES 2007/070071

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)  
A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	ES 2191516 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 01.09.2003, todo el documento.	7
A	MIGUEL, M. et al. "Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis". JOURNAL OF FOOD PROTECTION. 2004, Vol. 67, Nº 9, páginas 1914-1920; todo el documento.	1-9
PX	CENTENO, J.M. et al. "Lactoferricin-related peptides with inhibitory effects on ACE-dependent vasoconstriction". JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. 26.07.2006. Vol. 54, nº 15, páginas 5323-5329; todo el documento.	1-9

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

30 Julio 2007 (30.07.2007)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

10 de agosto de 2007 (10/08/2007)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

M. Novoa Sanjurjo

Nº de teléfono +34 91 349 84 66

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2007/070071

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1.  Las reivindicaciones n°s: 1-5 se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber: **Dichas reivindicaciones están afectadas por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) PCT, sobre métodos de tratamiento quirúrgico o terapéutico. Se ha realizado la búsqueda sobre los efectos de los péptidos de secuencias SEQ ID n°s 1 y 2**
2.  Las reivindicaciones n°s: se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3.  Las reivindicaciones n°s: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1.  Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2.  Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3.  Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4.  Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

- Indicación en cuanto a la protesta
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
  - Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
  - El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2007/070071

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2191516 6 A B	01.09.2003	NINGUNO	-----
-----			

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

*A61K 38/55* (2006.01)

*A61P 9/12* (2006.01)