



(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12P 21/06 (2006.01) A61K 38/57 (2006.01)  
C07K 1/36 (2006.01) A23J 3/34 (2006.01)  
C07K 5/11 (2006.01) A23L 1/305 (2006.01)  
C07K 14/79 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)  
A61K 38/07 (2006.01)

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):  
**MANZANARES MIR, Paloma** [ES/ES]; Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), E-46980 PATERNA (Valencia) (ES). **VALLÉS ALVENTOSA, Salvador** [ES/ES]; Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), E-46980 PATERNA (Valencia) (ES). **MARCOS LÓPEZ, José F.** [ES/ES]; Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), E-46980 PATERNA (Valencia) (ES). **RECIO SÁNCHEZ, Isidra** [ES/ES]; Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **RUIZ-GIMÉNEZ, Pedro** [ES/ES]; Fundación para la Investigación del Hospital La Fe de Valencia, Avenida Campanar, 21, E-46009 Valencia (ES). **TORREGROSA BERNABÉ, Germán** [ES/ES]; Fundación para la Investigación del Hospital La Fe de Valencia, Avenida Campanar, 21, E-46009 Valencia (ES). **ALBORCH DOMÍNGUEZ, Enrique** [ES/ES]; Fundación para la Investigación del Hospital La Fe de Valencia, Avenida Campanar, 21, E-46009 Valencia (ES). **SALOM SANVALERO, Juan B.** [ES/ES]; Fundación para la Investigación del Hospital La Fe de Valencia, Avenida Campanar, 21, E-46009 Valencia (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2012/070056

(22) Fecha de presentación internacional:

31 de enero de 2012 (31.01.2012)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201130260

28 de febrero de 2011 (28.02.2011)

ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):

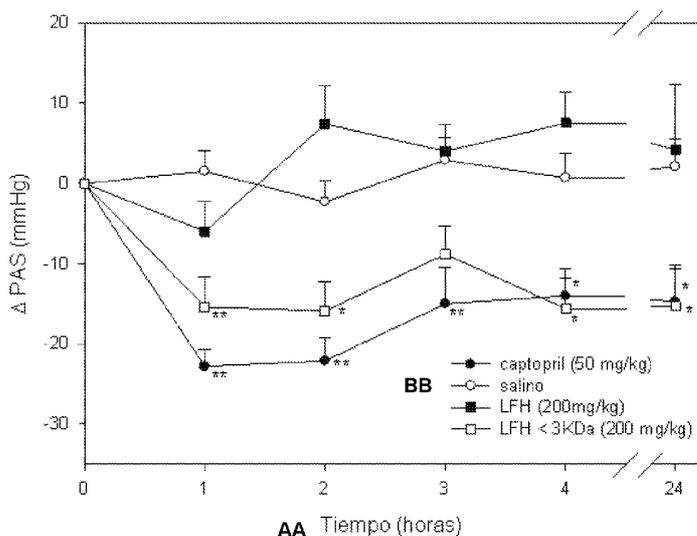
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL LA FE DE VALENCIA** [ES/ES]; Avenida Campanar, 21, E-46009 Valencia (ES).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: LACTOFERRIN HYDROLYSATE FRACTION WITH A LOW MOLECULAR WEIGHT FOR TREATING HYPERTENSION

(54) Título : FRACCIÓN DE BAJO PESO MOLECULAR DE UN HIDROLIZADO DE LACTOFERRINA PARA EL TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN

FIG. 1



AA...time (hours)

BB...saline

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining the lactoferrin hydrolysate fraction with a molecular weight of less than 3000 Da, comprising several peptides. The invention also relates to the lactoferrin hydrolysate fraction that can be obtained by said method and some of the peptides that it includes. The invention further relates to the use of said fraction and peptides for producing medicaments for the prevention and/or treatment of hypertension, and food or food supplements.

(57) Resumen: La invención se refiere a un método para obtener la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da de un hidrolizado de lactoferrina, el cual comprende diversos péptidos. La invención también engloba la fracción del hidrolizado de lactoferrina obtenible por dicho método y algunos de los péptidos que incluye, así como al uso de dicha fracción y péptidos para la elaboración de medicamentos para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión, así como alimentos o suplementos alimenticios.

WO 2012/117136 A1



(74) **Mandatario:** UNGRIA LÓPEZ, Javier; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(81) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

## **Fracción de bajo peso molecular de un hidrolizado de lactoferrina para el tratamiento de la hipertensión**

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología y la biomedicina. Específicamente, se refiere a un método para obtener la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da de un hidrolizado de lactoferrina, que comprende diversos péptidos. También se refiere a la fracción obtenible por este método, así como a algunos de los péptidos contenidos en dicha fracción y al uso de esta fracción o de los péptidos para la elaboración de medicamentos para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión, alimentos o suplementos alimenticios.

### **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

La hipertensión consiste en un aumento de la presión sanguínea por encima de unos niveles deseables, ya que este aumento conlleva riesgos para la salud. Esta hipertensión lleva asociado un aumento de la mortalidad de forma prematura en los individuos que la padecen (Giles 2009. *J Clin Hypertens* 11(11):611-614).

Uno de los mayores problemas generados por la hipertensión son los accidentes cerebrovasculares. Dentro de estos, el accidente cerebrovascular agudo (o ictus) es el más importante, ya que supone la tercera causa de mortalidad (tras el cáncer y las enfermedades isquémicas cardíacas) y la primera de incapacidad permanente en las sociedades avanzadas. Este ictus puede ser producido fundamentalmente por un trombo (trombosis) o por un émbolo (embolia) en una arteria cerebral, lo que produce un descenso de la irrigación sanguínea (isquemia) y por tanto la necrotización y muerte del tejido (infarto) que se queda sin irrigación. También puede ser producido por la rotura de un vaso sanguíneo en el parénquima cerebral (hemorragia intracerebral) o en la superficie cerebral (hemorragia subaracnoidea).

Otras posibles complicaciones producidas por la hipertensión son por ejemplo hipertrofia ventricular, fibrosis miocárdica, disfunción sistólica ventricular, disfunción diastólica ventricular, isquemia renal, fibrosis túbulo-intersticial del parénquima renal, glomeruloesclerosis focal, o aterosclerosis.

El tratamiento prolongado de disminución de la presión sanguínea mediante cambios en el estilo de vida o mediante tratamientos farmacológicos está asociado con reducción en el riesgo de padecer infarto (30-40%) y sucesos coronarios (20%) y parece que también reduce la incidencia de otras complicaciones.

Dado que se han relacionado alteraciones en el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA) con la hipertensión, se han desarrollado medicamentos antihipertensivos que utilizan como diana diferentes componentes de este sistema, como por ejemplo inhibidores de renina, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), bloqueantes de los receptores de angiotensina o antagonistas del receptor de aldosterona (Williams B 2009. *J Hypertens* 27(3):S19-26). Ejemplos de estos fármacos serían por ejemplo el captopril o el enalapril, los cuales son inhibidores de ECA. Estos fármacos pueden presentar efectos secundarios como tos seca, angioedema, cefaleas, sensación de inestabilidad, fatiga, hipotensión o astenia.

Debido a la necesidad en muchos de los casos no solo de administrar un fármaco, sino de cambiar los hábitos de vida de los pacientes, se ha tratado de buscar nuevos compuestos que sirvan para el tratamiento de la hipertensión que tengan un mayor número de aplicaciones, como por ejemplo que se encuentren incluidos en alimentos funcionales, a parte de su aplicación directa como fármacos. En este sentido se han utilizado tanto péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de plantas y animales tales como leche, soja o pescado, como péptidos sintéticos que mimetizan estos péptidos naturales o péptidos diseñados *de novo*. Dichos péptidos pueden ser producidos, por ejemplo, mediante la hidrólisis enzimática de las proteínas precursoras durante el procesamiento de los alimentos y la digestión. Estos péptidos pueden ser incorporados en alimentos para el desarrollo de productos

funcionales beneficiosos para la salud. En la actualidad, existen en el mercado o en desarrollo diversos productos que contienen estos péptidos bioactivos. Sin embargo, a pesar de estos desarrollos, los ensayos clínicos realizados hasta el momento con varios péptidos no han indicado un claro efecto beneficioso en todos los pacientes hipertensos (Engberink MF *et al* 2008. *Hypertension* 51(2):399-405; De Leo *et al* 2009. *Curr Pharm Des* 15(31):3622-3643).

Dado que los fármacos utilizados en la actualidad pueden producir efectos secundarios y los ensayos clínicos realizados con péptidos hasta la fecha no demuestran un claro efecto antihipertensivo, se hace necesaria una mejora en los medicamentos para controlar la hipertensión.

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un método de obtención de la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da de un hidrolizado de lactoferrina bovina (LF), así como a la propia fracción de peso molecular inferior a 3000 Da de un hidrolizado de lactoferrina obtenible por dicho método. La presente invención también se refiere a algunos de los péptidos contenidos en dicha fracción. Esta fracción, al igual que los péptidos que comprende, puede ser utilizada para la elaboración de medicamentos, preferiblemente para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión, así como para la elaboración de alimentos funcionales o suplementos alimenticios. La presente invención también se refiere a alimentos o composiciones que comprenden la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da de un hidrolizado de lactoferrina bovina (LF) o algunos de los péptidos que comprende.

En la presente invención se demuestra que la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da de un hidrolizado de lactoferrina bovina producido mediante hidrólisis con pepsina, presenta actividad antihipertensiva "*in vivo*". Como se observa en los ejemplos de la presente invención, este efecto antihipertensivo no se produce en caso de utilizar un hidrolizado de lactoferrina completo, sin seleccionar ninguna de sus fracciones. Este efecto puede ser debido

fundamentalmente a la eliminación de compuestos que interfieren o presentan un efecto antagónico a la capacidad hipotensora de péptidos de pequeño tamaño, o a la mayor concentración de estos péptidos de pequeño tamaño con efecto antihipertensivo en la fracción seleccionada. Por otro lado, en la presente invención también se demuestra que dentro de esta fracción de lactoferrina bovina producida mediante hidrólisis con pepsina, existen 3 péptidos (de secuencias SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11) los cuales también presentan capacidad antihipertensiva por sí mismos.

Un hidrolizado puede ser obtenido mediante hidrólisis enzimática o hidrólisis química (hidrólisis ácida o hidrólisis alcalina). No obstante, el método seleccionado para la realización de la hidrólisis confiere al producto unas características concretas que no pueden ser obtenidas por otro método ya que, por ejemplo, los distintos métodos utilizados darían lugar a una hidrólisis en diferentes enlaces peptídicos de la proteína, dando por tanto diferentes características estructurales y funcionales al producto resultante. La hidrólisis enzimática se produce en unas condiciones más controladas y los hidrolizados producidos son más reproducibles, por lo que el producto resultante presenta unas mejores características que los hidrolizados obtenidos mediante métodos químicos. Además, este hidrolizado enzimático no presenta compuestos químicos residuales en su composición lo que presenta ventajas a la hora de su uso frente a los hidrolizados químicos. En la presente invención la hidrólisis ha de ser controlada por lo que se produce mediante métodos enzimáticos.

La hidrólisis enzimática de las proteínas puede llevarse a cabo mediante diversas enzimas activas en diferentes condiciones. Dentro de las enzimas proteolíticas existen diversas opciones como las proteasas específicas de residuo o aquellas que degradan las proteínas inespecíficamente. Entre estas enzimas, una de las más utilizadas es la pepsina, enzima digestiva que degrada las proteínas en el estómago y que actúa rompiendo de forma preferencial los enlaces peptídicos de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos.

Posteriormente a la hidrólisis es necesario seleccionar la fracción que presenta la actividad antihipertensiva para eliminar los posibles elementos que presenten

acción contraria a la deseada o bien que interfieren con dicha acción. Esta selección se puede realizar por diversos métodos conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo mediante ultrafiltración a través de una membrana que presenta como tamaño de selección 3000 Da.

Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de una fracción de peso molecular inferior a 3000 Da de un hidrolizado de lactoferrina bovina (de ahora en adelante "método de la invención") que comprende:

- a) hidrolizar la lactoferrina bovina mediante hidrólisis con pepsina, y
- b) seleccionar la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da del hidrolizado del paso (a).

Se entiende por "fracción de peso molecular inferior a 3000 Da" en la presente invención aquella fracción del hidrolizado que comprende péptidos que no superan los 3000 Da de peso molecular, y que por tanto excluye diversos polipéptidos o bien fragmentos de la proteína original que no son digeridos por la hidrólisis de la invención.

Se entiende por "pepsina" en la presente invención aquellas enzimas con números EC (número de la Comisión de Enzimas o *Enzyme Commission number*) 3.4.23.1 (pepsina A), 3.4.23.2 (pepsina B o parapepsina I) ó 3.4.23.3 (pepsina C o gastricsina), o cualquiera de sus homólogas. Estas enzimas homólogas se pueden encontrar por ejemplo, aunque sin limitarse, tanto en animales como en plantas, hongos, protozoos o procariotas. Todas estas enzimas se encuentran incluidas en el grupo EC 3.4.23 (endopeptidasas aspárticas) por lo que los puntos de corte sobre las proteínas son similares y por tanto, a partir del mismo sustrato dan lugar a hidrolizados semejantes. Se entiende por "enzima homóloga" en este contexto aquellas enzimas que presentan la misma actividad que las enzimas descritas, es decir, aquellas enzimas que presentan cierta similitud estructural e igual funcionalidad con las enzimas descritas.

De estas enzimas la más común y ampliamente utilizada es la pepsina A. Esta

pepsina es la utilizada en los ejemplos de la invención para la realización de la hidrólisis. Por ello, en una realización preferida del método de la invención, la pepsina del paso (a) es pepsina A.

La hidrólisis ha de ser llevada a cabo en unas condiciones controladas, con el fin de evitar un exceso de hidrólisis de la lactoferrina producido por unas condiciones agresivas. Las condiciones no controladas podrían provocar la degradación de la lactoferrina bovina no únicamente mediante pepsina, o incluso la degradación de los péptidos activos. Por tanto, estas condiciones fuera de un rango establecido, pueden provocar la obtención de un producto final diferente. Además estas condiciones de reacción también pueden afectar a la actividad de la enzima utilizada y no solo a la proteína de origen, por lo que también podrían afectar a la composición final del hidrolizado. Dentro de estas condiciones de reacción una de las más importantes a tener en cuenta es el tiempo de hidrólisis, ya que este influye en el grado de degradación de la proteína original o de los productos (péptidos) intermedios y por tanto el porcentaje de diversos elementos en el hidrolizado final, o bien la presencia o ausencia de algunos de los mismos, puede variar dando diferente función al producto obtenido. En la presente invención, la situación óptima se da cuando la pepsina hidroliza el 100% de la lactoferrina inicial. A pesar de ello, aunque la digestión no sea total, la digestión parcial consigue que el hidrolizado presente actividad, ya que la posterior filtración elimina los elementos no digeridos permitiendo el mantenimiento de los péptidos producidos por la digestión parcial, algunos de los cuales son los que presentan actividad. Por todo ello, en otra realización preferida del método de la invención, la hidrólisis del paso (a) se realiza durante al menos 1 hora. En una realización más preferida del método de la invención, la hidrólisis se realiza durante un tiempo de entre 3 y 5 horas. En una realización aun más preferida del método de la invención, la hidrólisis del paso (a) se realiza durante 4 horas.

Otra de las condiciones a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo la hidrólisis es el pH al que se lleva a cabo la reacción. Este pH influye en la estabilidad de la lactoferrina bovina, así como en la actividad enzimática. La pepsina, para presentar actividad, necesita encontrarse en un entorno ácido (pH inferior a 7),

y presenta un máximo de actividad a un pH en torno a 3. Por todo ello, en otra realización preferida del método de la invención, la hidrólisis del paso (a) se realiza a un pH inferior a 7. En una realización más preferida del método de la invención, la hidrólisis se realiza a un pH de entre 2 y 4. En una realización aun más preferida del método de la invención, la hidrólisis del paso (a) se realiza a un pH de 3.

Otra de las condiciones esenciales para mantener la estabilidad de la lactoferrina bovina, y para la actividad enzimática es la temperatura. Ambas proteínas presentan estabilidad en torno a los 37°C. Por tanto en otra realización preferida del método de la invención, la hidrólisis del paso (a) se lleva a cabo a una temperatura de entre 25°C y 45°C. En una realización más preferida del método de la invención, la hidrólisis del paso (a) se realiza a una temperatura de entre 30°C y 40°C. En una realización aun más preferida del método de la invención, la hidrólisis del paso (a) se realiza a una temperatura de 37°C.

Para llevar a cabo la selección de la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da del hidrolizado, la cual presenta la actividad antihipertensiva, existen diversos métodos útiles conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo, aunque sin limitarse, cromatografía por filtración en gel, o ultrafiltración. De los posibles métodos de selección útiles en la presente invención el más práctico por sencillez y coste del mismo, y que ofrece mayores garantías para seleccionar correctamente la fracción deseada, sin elementos que puedan contaminarla, es la ultrafiltración. Por todo ello, en otra realización preferida del método de la invención, la selección de la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da del paso (b) se realiza mediante ultrafiltración.

En la presente invención se demuestra que la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da de un hidrolizado de lactoferrina, obtenida por el método de la invención, presenta un claro efecto antihipertensivo, el cual no se observa en caso de utilizar el hidrolizado completo sin llevar a cabo la selección de esta fracción. Por todo ello, otro aspecto de la invención se refiere a una fracción de

peso molecular inferior a 3000 Da de un hidrolizado de lactoferrina obtenible por el método de la invención, de ahora en adelante "fracción de la invención".

En la presente invención, se demuestra que incluidos dentro de esta fracción de la invención se encuentran 3 péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, los cuales, al igual que en el caso de la fracción de la invención, también presentan un efecto antihipertensivo en experimentos "*in vivo*". Por todo ello, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a la fracción de la invención, donde la fracción comprende al menos uno de los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:11. En una realización más preferida la fracción de la invención comprende los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11.

En la presente invención se demuestra la presencia de diversos péptidos dentro de la fracción de la invención. Estos péptidos identificados son analizados para determinar su capacidad antihipertensiva. De todos los péptidos identificados, los péptidos SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11 son los que presentan mejores características antihipertensivas. Estos péptidos pueden ser aislados de la fracción de la invención o bien pueden ser sintetizados *de novo* mediante síntesis química. En la presente invención se observa que los péptidos sintetizados *de novo* presentan la actividad antihipertensiva. Por todo ello, otro aspecto de la invención se refiere a un péptido de secuencia SEQ ID NO:9. Otro aspecto de la invención se refiere a un péptido de secuencia SEQ ID NO:10. Otro aspecto de la invención se refiere a un péptido de secuencia SEQ ID NO:11.

Los péptidos de la presente invención y sus variantes o derivados pueden ser producidos mediante distintos procedimientos. Pueden ser obtenidos, por ejemplo mediante su aislamiento de un hidrolizado de lactoferrina. También pueden ser obtenidos mediante otros métodos conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo, aunque sin limitarse, síntesis química o síntesis biotecnológica en fase sólida o mediante aproximaciones de ADN recombinante. Los péptidos de la invención pueden producirse mediante ADN recombinante, no sólo directamente sino como polipéptidos de fusión unidos a

un polipéptido heterólogo, el cual puede contener, por ejemplo aunque sin limitarnos, una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de corte por una proteasa, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en el extremo N-terminal de la proteína madura o del polipéptido.

En el sentido utilizado en la descripción, el término "variante" se refiere a un péptido que presenta una elevada identidad con los descritos y que presenta por ejemplo, aunque sin limitarse, adiciones, deleciones o sustituciones. Estas variantes presentan un grado de identidad con respecto a los péptidos descritos de, al menos, un 75%, preferentemente de, al menos, un 85%, más preferentemente de, al menos, un 90% y aun más preferentemente, un 95%.

Los términos "péptido", "polipéptido", "proteína" o "secuencia aminoacídica" se usan de forma intercambiable en la presente invención, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar o no, química o bioquímicamente modificados.

El término "lactoferrina bovina" tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la proteína de 689 residuos de aminoácidos (número de acceso del *Protein Data Bank* (PDB): 1BLF; SEQ ID NO:13), derivada de la proteína traducida de 708 aminoácidos (número de acceso al GenBank: AAA30610; SEQ ID NO:14) codificada por el cDNA de número de acceso al GenBank: L19981.1 (SEQ ID NO:15). También se incluyen dentro de esta definición aquellos péptidos que presentan una identidad de al menos un 95% y preferiblemente un 99% con respecto a SEQ ID NO:13, que dan lugar a la fracción de la invención y/o a los péptidos de la invención. Estos péptidos pueden ser producidos, por ejemplo mediante sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos respecto a la secuencia SEQ ID NO:13.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la fracción de la invención, preferiblemente que comprenda al menos uno de los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, o SEQ ID NO:11, y más preferiblemente que comprenda los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a la fracción

de la invención, preferiblemente que comprenda al menos uno de los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, o SEQ ID NO:11, y más preferiblemente que comprenda los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, para su uso en medicina.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de secuencia SEQ ID NO:9 en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, al péptido de secuencia SEQ ID NO:9 para su uso en medicina.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de secuencia SEQ ID NO:10 en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, al péptido de secuencia SEQ ID NO:10 para su uso en medicina.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de secuencia SEQ ID NO:11 en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, al péptido de secuencia SEQ ID NO:11 para su uso en medicina.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la fracción de la invención, preferiblemente que comprenda al menos uno de los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, o SEQ ID NO:11, y más preferiblemente que comprenda los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión, o alternativamente, a la fracción de la invención, preferiblemente que comprenda al menos uno de los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, o SEQ ID NO:11, y más preferiblemente que comprenda los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de secuencia SEQ ID NO:9 en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión, o alternativamente, al péptido de secuencia SEQ ID NO:9 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de secuencia SEQ ID

NO:10 en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión, o alternativamente, al péptido de secuencia SEQ ID NO:10 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de secuencia SEQ ID NO:11 en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión, o alternativamente, al péptido de secuencia SEQ ID NO:11 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión.

El término "medicamento", hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el ser humano y los animales. El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El "medicamento de uso humano" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El "medicamento de uso veterinario" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario.

El término "tratamiento" tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

Se entiende por "hipertensión" en la presente invención, una presión arterial sistémica igual o superior a unos valores control conocidos en el estado de la técnica, que preferiblemente son de 140 mm de mercurio de presión arterial sistólica y/o 90 mm de mercurio de presión arterial diastólica. Esta hipertensión se presenta fundamentalmente como hipertensión arterial. Existen 2 formas básicas de hipertensión: la hipertensión sanguínea esencial o primaria, y la hipertensión sanguínea secundaria. La hipertensión sanguínea esencial es debida, por norma general, a una resistencia elevada a la circulación como consecuencia, por ejemplo, del estrechamiento, al comienzo puramente funcional y posteriormente orgánico, de la vía sanguínea arterial. La hipertensión sanguínea secundaria o también sintomática es, por el contrario, una hipertensión sanguínea vinculada con un órgano, es decir provocada por la enfermedad de un órgano, que puede exteriorizarse, por ejemplo, aunque sin limitarse, como una hipertensión endocrina, renal, pulmonar o cardiovascular.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la fracción de la invención, preferiblemente que comprenda al menos uno de los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:11, y más preferiblemente que comprenda los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, en la elaboración de un alimento, o alternativamente, a la fracción de la invención, preferiblemente que comprenda al menos uno de los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:11, y más preferiblemente que comprenda los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, para su uso como alimento. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de dicha fracción en la elaboración de un alimento funcional, o alternativamente, a dicha fracción

para su uso como alimento funcional. Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de dicha fracción en la elaboración de un alimento funcional para la prevención de la hipertensión, o alternativamente, a dicha fracción para su uso como alimento funcional para la prevención de la hipertensión.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de secuencia SEQ ID NO:9 en la elaboración de un alimento, o alternativamente, al péptido de secuencia SEQ ID NO:9 para su uso como alimento. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de dicho péptido en la elaboración de un alimento funcional, o alternativamente, a dicho péptido para su uso como alimento funcional. Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de dicho péptido en la elaboración de un alimento funcional para la prevención de la hipertensión, o alternativamente, a dicho péptido para su uso como alimento funcional para la prevención de la hipertensión.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de secuencia SEQ ID NO:10 en la elaboración de un alimento, o alternativamente, al péptido de secuencia SEQ ID NO:10 para su uso como alimento. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de dicho péptido en la elaboración de un alimento funcional, o alternativamente, a dicho péptido para su uso como alimento funcional. Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de dicho péptido en la elaboración de un alimento funcional para la prevención de la hipertensión, o alternativamente, a dicho péptido para su uso como alimento funcional para la prevención de la hipertensión.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de secuencia SEQ ID NO:11 en la elaboración de un alimento, o alternativamente, al péptido de secuencia SEQ ID NO:11 para su uso como alimento. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de dicho péptido en la elaboración de un alimento funcional, o alternativamente, a dicho péptido para su uso como alimento funcional. Una realización más preferida de este aspecto

de la invención se refiere al uso de dicho péptido en la elaboración de un alimento funcional para la prevención de la hipertensión, o alternativamente, a dicho péptido para su uso como alimento funcional para la prevención de la hipertensión.

Se entiende por "alimento funcional" en la presente invención aquel alimento que se demuestra que afecta de forma beneficiosa a una o más funciones del organismo, más allá de los efectos nutricionales, en el sentido de ser relevante para un óptimo estado de salud o para la reducción del riesgo de padecer una enfermedad o condición patológica. En el contexto de la presente invención se refiere, preferiblemente, a la reducción del riesgo de padecer hipertensión. Esta expresión por tanto incluye también alimentos importantes en el mantenimiento a medio o largo plazo de la salud así como en su mejora. En este contexto, se prefieren usos no terapéuticos. Las expresiones "nutracéuticos", "alimentocéuticos" y "alimentos de diseño" se usan como sinónimos.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la fracción de la invención, preferiblemente que comprenda al menos uno de los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:11, y más preferiblemente que comprenda los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, para la elaboración de un suplemento alimenticio, o alternativamente a dicha fracción para su uso como suplemento alimenticio. Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de secuencia SEQ ID NO:9 para la elaboración de un suplemento alimenticio, o alternativamente a dicho péptido para su uso como suplemento alimenticio. Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de secuencia SEQ ID NO:10 para la elaboración de un suplemento alimenticio, o alternativamente a dicho péptido para su uso como suplemento alimenticio. Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de secuencia SEQ ID NO:11 para la elaboración de un suplemento alimenticio, o alternativamente a dicho péptido para su uso como suplemento alimenticio.

Se entiende por "suplemento alimenticio" en la presente invención productos alimenticios que contienen uno o más nutrientes en forma concentrada. Suelen

encontrarse en forma alimenticia atípica, preferiblemente en cápsulas, pastillas, comprimidos o líquidos. Formas típicas adicionales de administración de estos suplementos alimenticios son, por ejemplo, aunque sin limitarnos, sobres con polvos, ampollas con líquidos, frascos con insertos de goteo y formas de administración similares de líquidos y polvos para la captación en pequeñas cantidades medidas que son útiles para suplementar la nutrición.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante primera composición de la invención, que comprende la fracción de la invención, que preferiblemente comprende al menos uno de los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:11, y más preferiblemente comprende los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11. En una realización preferida de este aspecto de la invención la composición es una composición farmacéutica.

Otro aspecto se refiere a una composición, de ahora en adelante segunda composición de la invención, que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO:9. En una realización preferida de este aspecto de la invención la composición es una composición farmacéutica.

Otro aspecto se refiere a una composición, de ahora en adelante tercera composición de la invención, que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO:10. En una realización preferida de este aspecto de la invención la composición es una composición farmacéutica.

Otro aspecto se refiere a una composición, de ahora en adelante cuarta composición de la invención, que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO:11. En una realización preferida de este aspecto de la invención la composición es una composición farmacéutica.

Otro aspecto se refiere a una composición, de ahora en adelante quinta composición de la invención, que comprende los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización preferida de este aspecto de la invención la composición es

una composición farmacéutica.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en soluciones acuosas o no acuosas, en emulsiones o en suspensiones. Ejemplos de soluciones no acuosas son, por ejemplo, pero sin limitarse, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, o ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Ejemplos de soluciones acuosas, son por ejemplo, pero sin limitarse, agua, soluciones alcohólicas en agua, o medios salinos. Las soluciones acuosas pueden estar tamponadas o no, y pueden tener componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, o similares, o nutrientes, incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas o minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a: aglutinantes, tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes, tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes, tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes, tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes, tales como menta o salicilato de metilo.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, a oral, nasal, ótica, ocular, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, vía rectal, vía vaginal o uretral, mediante la administración de un supositorio, percutánea, spray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

Las composiciones de la presente invención son aptas para su aplicación mediante dispositivos médicos que permitan su liberación en concentraciones adecuadas para el tratamiento. Estos dispositivos deben ser adecuados para la administración del fármaco de forma local que permita que el tratamiento no se disperse y actúe en la zona afectada. Los dispositivos pueden, por ejemplo, pero sin limitarse, llevar los fármacos en su interior o ir recubiertos de los mismos. Dentro de estos dispositivos se pueden encontrar, por ejemplo, dispositivos de asistencia circulatoria, de procedimientos endovasculares y cirugía cardiovascular, y dentro de estos, por ejemplo, pero sin limitarse, *stents*, válvulas, anillos, suturas, parches o injertos vasculares.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y/u otro/s principio/s activo/s, y pueden ser administradas solas o en combinación con otras composiciones farmacéuticas o medicamentos destinados al tratamiento y/o prevención de la hipertensión.

Otro aspecto de la invención se refiere a un alimento que comprende la fracción de la invención, que preferiblemente comprende al menos uno de los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:11, y más preferiblemente que comprende los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el alimento es un alimento funcional.

Otro aspecto de la invención se refiere a un alimento que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO:9. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el alimento es un alimento funcional.

Otro aspecto de la invención se refiere a un alimento que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO:10. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el alimento es un alimento funcional.

Otro aspecto de la invención se refiere a un alimento que comprende el péptido

de secuencia SEQ ID NO:11. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el alimento es un alimento funcional.

Otro aspecto de la invención se refiere a un alimento que comprende los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el alimento es un alimento funcional.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, 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.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Disminución de la presión arterial sistólica (PAS), obtenida en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), tras la administración oral de 1ml de suero salino (○), 50 mg/kg captopril (●), 200 mg/kg hidrolizado de lactoferrina obtenido con pepsina (■) y 200 mg/kg fracción del hidrolizado de lactoferrina obtenido con pepsina menor de 3000 Da (□). \*significativamente diferente con respecto al control ( $P < 0,05$ ) y \*\*significativamente diferente con respecto al control ( $P < 0,01$ ). Los datos representan la media  $\pm$  EMS para un mínimo de 5 animales.

**Figura 2.** A: Cromatograma obtenido utilizando cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC) de la fracción menor de 3000 Da producida mediante la hidrólisis de lactoferrina con pepsina, en el que se seleccionan 13 subfracciones (F1-F13). B: Actividad inhibidora de ECA, expresada como la concentración proteica necesaria para inhibir el 50 % de la actividad enzimática ( $IC_{50}$ ), correspondiente a cada una de las 13 fracciones recogidas mediante

RP-HPLC.

**Figura 3.** Disminución de la presión arterial sistólica (PAS), obtenida en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), tras la administración oral de 1ml de suero salino (○), 50 mg/kg captopril (●), 10 mg/kg SEQ ID NO:9 (△), 10 mg/kg SEQ ID NO:10 (■) y 10 mg/kg SEQ ID NO:11 (□). \*significativamente diferente con respecto al control ( $P < 0,05$ ) y \*\*significativamente diferente con respecto al control ( $P < 0,01$ ). Los datos representan la media  $\pm$  EMS para un mínimo de 5 animales.

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

### **EJEMPLO 1. Obtención de péptidos con efecto antihipertensivo a partir de LF.**

Lactoferrina bovina (USB Corporation, Cleveland OH USA) se disuelve en agua a una concentración de 50 mg/ml. La solución se ajusta a pH 3 con HCl 1 M y se le adiciona pepsina (3% en peso). La hidrólisis se realiza a 37°C durante 4 h con agitación suave. La hidrólisis se detiene mediante calentamiento a 80°C durante 15 min, se ajusta el pH a 7 (NaOH 1 M) y se centrifuga (4000 rpm 30 min). La fracción de peso molecular inferior a 3000 Da del hidrolizado de lactoferrina obtenido mediante la hidrólisis con pepsina durante 4 h, se obtuvo mediante ultrafiltración a través de una membrana de 3000 Da (membrana de polietersulfona VivaFlow50 3000 Da, Vivascience, Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, Francia). Se midió la actividad inhibidora de ECA en la fracción de

peso molecular inferior a 3000 Da utilizando un método fluorimétrico descrito en la bibliografía (Sentandreu & Toldra, *Food Chemistry*, 97 (3), 546-554) basado en la hidrólisis del sustrato fluorescente *o*-aminobenzoilglicil-*p*-nitrophenilalanilprolina. El valor de IC<sub>50</sub> calculado a partir de las curvas dosis respuesta fue de 14,3 ± 3,3 µg/ml.

Se evaluó el efecto hipotensor del hidrolizado de LF con pepsina y de la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da a una dosis de 200 mg/kg empleando ratas espontáneamente hipertensas (SHR). La Figura 1 muestra los cambios de la presión arterial sistólica (PAS) en SHR a distintos tiempos tras la administración oral de la dosis correspondiente. Así mismo se incluye la variación de la PAS observada tras la administración de captopril (control positivo, dosis de 50 mg/kg) o salino (control negativo).

La fracción de peso molecular inferior a 3000 Da mostró un efecto antihipertensivo significativo a la hora y a las dos horas de su administración oral (P<0,01 y P<0,05 respectivamente), mientras que dicho efecto no se observó en el caso del hidrolizado completo de LF. El efecto antihipertensivo de la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da volvió a ser significativo a las 4 horas de la ingesta y se mantuvo hasta las 24 h, observándose un comportamiento similar al del control positivo captopril.

Con objeto de identificar los péptidos responsables de la actividad antihipertensiva, la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da se fraccionó mediante RP-HPLC a escala semipreparativa. Tal y como se muestra en la Figura 2A se recogieron 13 fracciones, en cantidad suficiente para su posterior análisis. Como se muestra en la Figura 2B las sub-fracciones más activas fueron las fracciones número 1, 3, 6 y 12, que se analizaron por espectrometría de masas en tándem para determinar sus péptidos constituyentes. Los péptidos identificados se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Péptidos identificados en las subfracciones 1, 3, 6 y 12 de la fracción menor de 3000 Da del hidrolizado de lactoferrina con pepsina durante cuatro horas.

Fracción nº	Masa teórica	Masa experimental	Posición	Aminoácidos	Secuencia nº
1	531,3	531,3	52-56	KKADA	SEQ ID NO:1
1	730,4	730,3	97-103	VVKKGSN	SEQ ID NO:2
3	595,3	595,2	612-616	LHQQA	SEQ ID NO:3
3	410,2	410,0	400-403	YTAG	SEQ ID NO:4
6	802,5	802,4	25-31	RMKKLGA	SEQ ID NO:5
6	708,4	708,3	612-617	LHQQAL	SEQ ID NO:6
6	534,3	534,3	148-152	AVAKF	SEQ ID NO:7
6	757,4	757,3	319-324	YLGSRV	SEQ ID NO:8
6	547,3	547,2	133-136	RPYL	SEQ ID NO:9
12	770,4	770,3	232-238	LNNSRAP	SEQ ID NO:10
12	671,4	671,4	266-270	LIWKL	SEQ ID NO:11
12	737,4	737,3	315-321	DSALYLG	SEQ ID NO:12

**EJEMPLO 2. Péptidos con efecto antihipertensivo obtenidos mediante síntesis química.**

Se sintetizaron químicamente todos los péptidos identificados, mencionados en la Tabla 1 del ejemplo 1, mediante el método Fmoc en fase sólida (GenScript Corporation, Piscataway, NJ, pureza >90%). Los ensayos de inhibición *in vitro* a una concentración de 20  $\mu$ M mostraron que sólo tres de ellos (SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11) presentaban actividad inhibitoria de ECA. Los valores de IC<sub>50</sub> correspondientes a estas tres secuencias se muestran en la Tabla 2. Destaca por su actividad SEQ ID NO:11, con un valor de IC<sub>50</sub> inferior a 1  $\mu$ M.

**Tabla 2.** Actividad inhibidora de ECA de las secuencias SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 identificadas en las subfracciones 6 y 12 de la fracción menor de 3000 Da del hidrolizado de lactoferrina con pepsina durante cuatro horas.

Secuencia nº	Aminoácidos	<sup>a</sup> IC <sub>50</sub> (µM)
SEQ ID NO:9	RPYL	56,5 ± 1,9
SEQ ID NO:10	LNNSRAP	105,0 ± 6,4
SEQ ID NO:11	LIWKL	0,47 ± 0,01

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> es la media ± EMS de al menos tres experimentos independientes.

Se midió la capacidad de inhibición de la vasoconstricción dependiente de ECA de los péptidos SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11 en ensayos funcionales *ex vivo* con arterias aisladas. Los resultados se resumen en la Tabla 3 e indican la contracción en respuesta a angiotensina-I (1 µM), en % respecto a una respuesta previa en el mismo segmento arterial, y se expresan como la media ± EMS de los experimentos realizados en (n) segmentos arteriales.

**Tabla 3.** Efecto inhibitor de las secuencias SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11 (concentración 20 µM) identificadas en las subfracciones 6 y 12 de la fracción menor de 3000Da del hidrolizado de lactoferrina con pepsina durante cuatro horas, sobre la contracción ECA-dependiente en arterias aisladas de conejo.

Secuencia nº	Aminoácidos	Contracción (%)
Control		80 ± 4 (17)
SEQ ID NO:9	RPYL	69 ± 3 (11)*
SEQ ID NO:10	LNNSRAP	72 ± 4 (5)
SEQ ID NO:11	LIWKL	62 ± 3 (8)**

\* Significativamente menor respecto a su control (P<0,05).

\*\* Significativamente menor respecto a su control (P<0,01).

Los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:11 produjeron inhibiciones significativas de la contracción dependiente de ECA en comparación con el control sin péptido. Aunque las contracciones inducidas por angiotensina I en los segmentos preincubados con SEQ ID NO:10 fueron menores que el control, la reducción no fue estadísticamente significativa.

Por último, se evaluó el efecto antihipertensivo de los tres péptidos (SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11) administrándolos por vía oral a una

dosis de 10 mg/kg a ratas SHR. La Figura 3 muestra los cambios de la PAS a distintos tiempos tras su administración oral. También se incluyen los resultados obtenidos tras la administración de salino y de 50 mg/kg de captopril.

Los tres péptidos evaluados mostraron efecto antihipertensivo significativo transcurrida 1 hora desde su administración oral ( $P < 0,01$ ). Mientras que SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10, perdieron su efecto una vez transcurridas 2 horas tras su administración, el péptido de secuencia SEQ ID NO:11 mantuvo su efecto antihipertensivo a lo largo de las 24 h de duración del experimento, con un comportamiento similar al del control positivo captopril.

Los resultados presentados demuestran que el péptido identificado por la secuencia SEQ ID NO:11 tiene un claro y pronunciado efecto antihipertensivo, que tras su administración aguda por vía oral sigue un curso temporal semejante al efecto antihipertensivo que se aprecia cuando se administra la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da ( $< 3000$  Da) del hidrolizado de LF con pepsina (Figura 1 y Figura 3).

**REIVINDICACIONES**

1. Método de obtención de una fracción de peso molecular inferior a 3000 Da de un hidrolizado de lactoferrina bovina que comprende:
  - a) hidrolizar la lactoferrina bovina mediante hidrólisis con pepsina, y
  - b) seleccionar la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da del hidrolizado del paso (a).
2. Método según la reivindicación 1 donde la pepsina del paso (a) es pepsina A.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde la hidrólisis del paso (a) se realiza durante al menos 1 hora.
4. Método según la reivindicación 3 donde la hidrólisis se realiza durante entre 3 y 5 horas.
5. Método según la reivindicación 4 donde la hidrólisis se realiza durante 4 horas.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la hidrólisis del paso (a) se realiza a un pH inferior a 7.
7. Método según la reivindicación 6 donde la hidrólisis del paso (a) se realiza a un pH de entre 2 y 4.
8. Método según la reivindicación 7 donde la hidrólisis del paso (a) se realiza a un pH de 3.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde la hidrólisis del paso (a) se realiza a una temperatura de entre 25 y 45 °C.
10. Método según la reivindicación 9 donde la hidrólisis del paso (a) se realiza a una temperatura de entre 30 y 40 °C.

11. Método según la reivindicación 10 donde la hidrólisis del paso (a) se realiza a una temperatura de 37 °C.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde la selección de la fracción de peso molecular inferior a 3000 Da del paso (b) se realiza mediante ultrafiltración.

13. Fracción de peso molecular inferior a 3000 Da de un hidrolizado de lactoferrina obtenible por un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14. Fracción según la reivindicación 13 que comprende al menos uno de los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:11.

15. Fracción según la reivindicación 14 que comprende los péptidos de secuencia SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11.

16. Péptido de secuencia SEQ ID NO:9.

17. Péptido de secuencia SEQ ID NO:10.

18. Péptido de secuencia SEQ ID NO:11.

19. Uso de una fracción según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 o de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 en la elaboración de un medicamento.

20. Uso de una fracción según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 o de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión.

21. Uso de una fracción según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 o de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 para la elaboración de un alimento.

22. Uso según la reivindicación 21 donde el alimento es un alimento funcional.

23. Uso de una fracción según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 o de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 para la elaboración de un suplemento alimenticio.

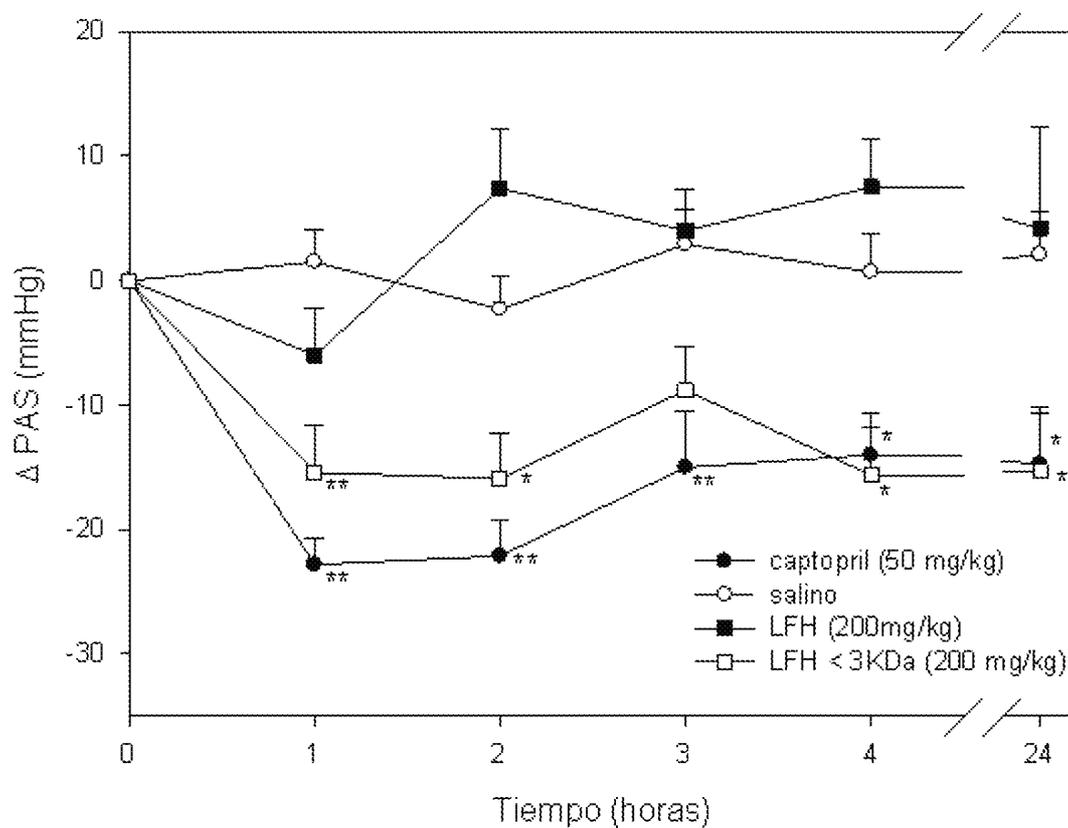
24. Composición que comprende una fracción según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 o al menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18.

25. Composición según la reivindicación 24 donde la composición es una composición farmacéutica.

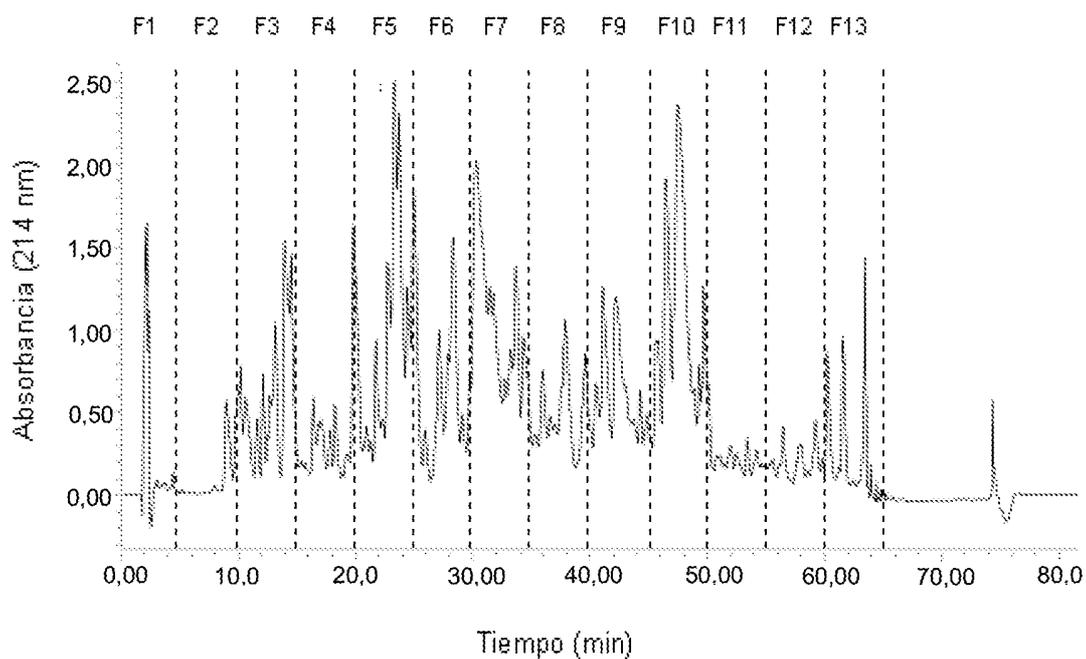
26. Alimento que comprende una fracción según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 o al menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18.

27. Alimento según la reivindicación 26 donde el alimento es un alimento funcional.

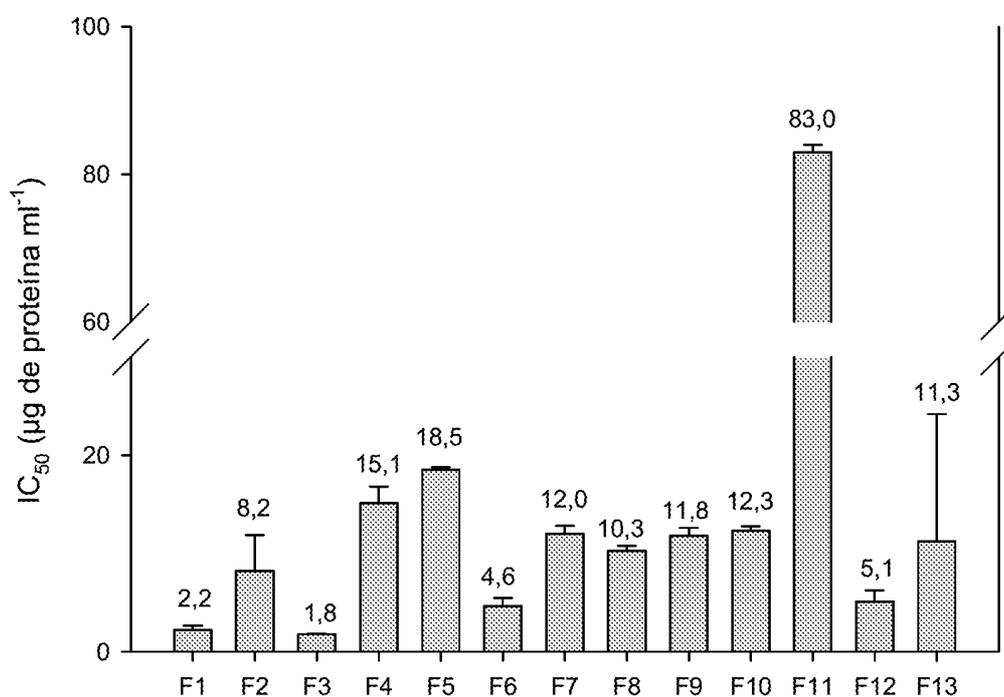
**FIG. 1**



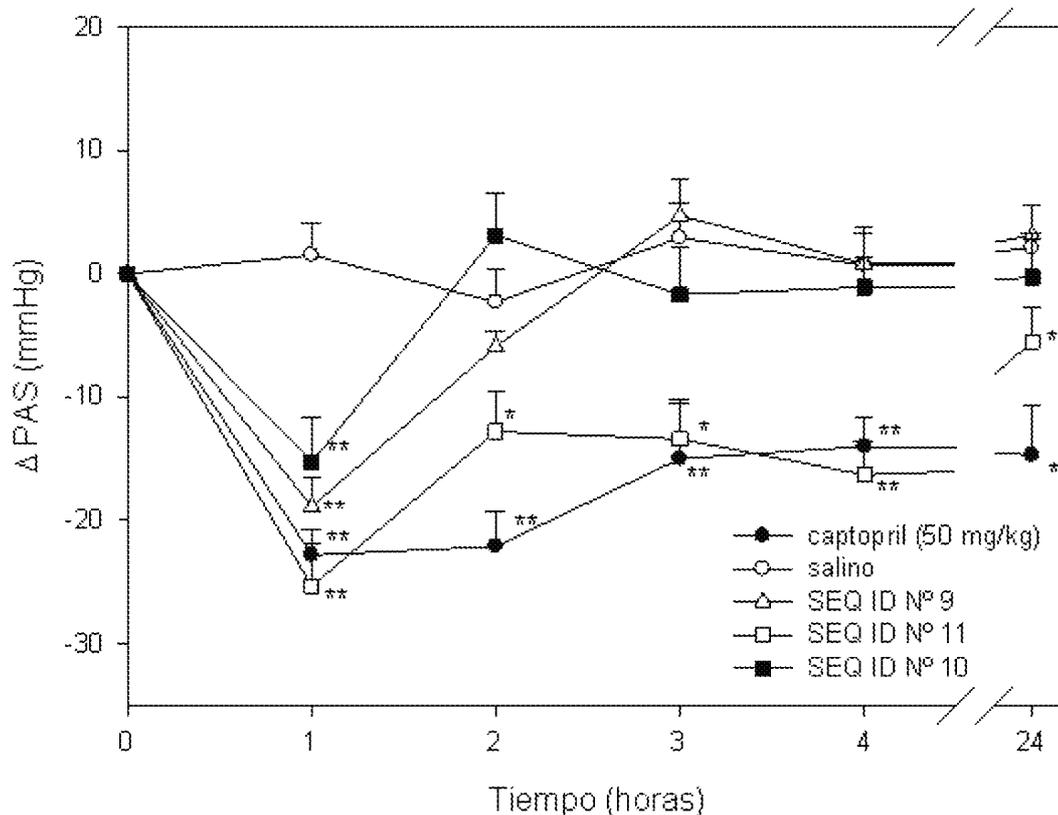
**FIG. 2A**



**FIG. 2B**



**FIG. 3**



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES2012/070056

**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)

C12P, C07K, A61K, A23J, A23L, 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)

**EPODOC, INVENES, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, WPI, GOOGLE****C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HERNÁNDEZ-LEDESMA, E. et al. "Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin". INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL. 01.01.2007. Vol. 17, N°. 1, pages 42 - 49; the whole document, specially paragraph 2.2.	1-15, 19-27
X	TSOPMO, A. et al. "Tryptophan released from mother's milk has antioxidant properties". PEDRIATIC RESEARCH. 01.12.2009. Vol. 66, N°. 6, pages 614 - 618; methods.	1-15, 19, 21-27
Y	WO 2010125192 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS & UNIVERSIDAD DE SALAMANCA) 04.11.2010, the whole document, specially example 1.	1-15, 19-27

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

* Special categories of cited documents:	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"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
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06/06/2012Date of mailing of the international search report  
(07/06/2012)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
M. Novoa SanjurjoOFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498466

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES2012/070056

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	2328435 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 12.11.2009, the whole document, specially example 1.	1-15, 19-27
Y	RECIO, I. et al. "Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin. In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane". JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A. 29.01.1999. Vol. 831, N° 2, pages 191 - 201; paragraph 2.1.	1-15, 19, 21-27

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES2012/070056

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2010125192 A	04.11.2010	EP2253324 A EP20090159243	24.11.2010 30.04.2009
----- ES2328435 AB	----- 12.11.2009	----- WO2007113365 AB ES2321358 AB	----- 11.10.2007 04.06.2009
-----	-----	-----	-----

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070056

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12P21/06* (2006.01)

*C07K1/36* (2006.01)

*C07K5/11* (2006.01)

*C07K14/79* (2006.01)

*A61K38/07* (2006.01)

*A61K38/57* (2006.01)

*A23J3/34* (2006.01)

*A23L1/305* (2006.01)

*A61P9/12* (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070056

## 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)

C12P, C07K, A61K, A23J, A23L, 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)

EPODOC, INVENES, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, WPI, GOOGLE

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	HERNÁNDEZ-LEDESMA, E. et al. "Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin". INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL. 01.01.2007. Vol. 17, Nº. 1, páginas 42 - 49; todo el documento, especialmente apartado 2.2.	1-15, 19-27
X	TSOPMO, A. et al. "Tryptophan released from mother's milk has antioxidant properties". PEDIATRIC RESEARCH. 01.12.2009. Vol. 66, Nº. 6, páginas 614 - 618; métodos.	1-15, 19, 21-27
Y	WO 2010125192 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS & UNIVERSIDAD DE SALAMANCA) 04.11.2010, todo el documento, especialmente ejemplo 1.	1-15, 19-27

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"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).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"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.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"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.</p> <p>"&amp;" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
06/06/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**07 de junio de 2012 (07/06/2012)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
M. Novoa Sanjurjo  
Nº de teléfono 91 3498466

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud internacional n°

PCT/ES2012/070056

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	2328435 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 12.11.2009, todo el documento, especialmente ejemplo 1.	1-15, 19-27
Y	RECIO, I. et al. "Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin. In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane". JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A. 29.01.1999. Vol. 831, N° 2, páginas 191 - 201; apartado 2.1.	1-15, 19, 21-27

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2012/070056

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2010125192 A	04.11.2010	EP2253324 A EP20090159243	24.11.2010 30.04.2009
----- ES2328435 AB	----- 12.11.2009	----- WO2007113365 AB ES2321358 AB	----- 11.10.2007 04.06.2009
-----	-----	-----	-----

**CLASIFICACIONES DE INVENCION**

*C12P21/06* (2006.01)

*C07K1/36* (2006.01)

*C07K5/11* (2006.01)

*C07K14/79* (2006.01)

*A61K38/07* (2006.01)

*A61K38/57* (2006.01)

*A23J3/34* (2006.01)

*A23L1/305* (2006.01)

*A61P9/12* (2006.01)