



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 321 358**

② Número de solicitud: 200600881

⑤ Int. Cl.:
A61K 38/55 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **05.04.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2009**

Fecha de la concesión: **22.02.2010**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **05.03.2010**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
05.03.2010

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Valencia y
Fundación para la Investigación del Hospital La
Fe de Valencia**

⑱ Inventor/es: **Manzanares Mir, Paloma;
Marcos López, José Francisco;
Enrique López, María;
Vallés Alventosa, Salvador;
Centeno Guil, José María;
Salom Sanvalero, Joan Bta.;
Torregrosa Bernabé, Germán y
Alborch Domínguez, Enrique**

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Uso de péptidos derivados de la lactoferrina para preparar formulaciones inhibidoras de la enzima convertora de angiotensina I.**

㉑ Resumen:

Uso de péptidos derivados de la lactoferrina para preparar formulaciones inhibidoras de la enzima convertora de angiotensina I.

La invención consiste en la utilización de productos bioactivos derivados de las proteínas lácteas. Se trata de un péptido de quince residuos de aminoácidos (llamado LfcinB17 31), y de otro que es una versión reducida del mismo (llamado LfcinB20 25), derivados de la lactoferrina bovina como inhibidores efectivos de la enzima convertora de la angiotensina (ECA). Los péptidos objeto de la patente se pueden obtener químicamente, biotecnológicamente y dan lugar a péptidos con actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina *in vitro* y/o *ex vivo*, midiendo la disminución de la contracción de arterias carótidas de conejo inducida por exposición a angiotensina I. Estos productos nutracéuticos, ya sea como péptido bioactivos, son tanto útiles para la industria alimentaria como para la farmacéutica.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Uso de péptidos derivados de la lactoferrina para preparar formulaciones inhibitoras de la enzima convertidora de angiotensina I.

5

Sector de la técnica

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

10 **Estado de la técnica**

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 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 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”).

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 convertidora 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 AT₁”. 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., Wyvratt, 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 in-

hibitors. *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 (Baltimore-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 [β -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., Cuniassé, 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 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. (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 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 α -zein of thermolysin peptides 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 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*. *Agric. Biol. Chem.* 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. *Am. J. Enol. Vitic.* 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].

Por otra parte, las Lactoferrinas (LF) son glicoproteínas abundantes en la leche materna de mamíferos y tienen múltiples funciones biológicas, entre las que destacan sus propiedades antimicrobianas [Farnaud, S. y Evans, R. W. (2003). Lactoferrin - a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology* 40, 395-405; Orsi, N. (2004). The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives. *BioMetals* 17, 189-196]. Lactoferrinas recombinantes de origen humano o vacuno han sido producidas en hongos, plantas y animales mediante la tecnología del DNA recombinante, con vistas a obtener efectos terapéuticos o para su utilización en alimentos funcionales [Nandi, S., Suzuki, Y. A., Huang, J. M., Yalda, D., Pham, P., Wu, L. Y., Bartley, G., Huang, N., y Lonnerdal, B. (2002). Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Science* 163, 713-722; van Berkel, P. H. C., Welling, M. M., Geerts, M., van Veen, H. A., Ravensbergen, B., Salaheddine,

M., Pauwels, E. K. J., Pieper, F., Nuijens, J. H., y Nibbering, P. H. (2002). Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nature Biotechnology* 20, 484-487; Ward, P. P., Piddington, C. S., Cunningham, G. A., Zhou, X. D., Wyatt, R. D., y Conneely, O. M. (1995). A system for production of commercial quantities of human Lactoferrin - A broad-spectrum natural antibiotic. *Bio-Technology* 13, 498-503; Zhang, Z. Y., Coyne, D. P., Vidaver, A. K., y Mitra, A. (1998). Expression of human lactoferrin cDNA confers resistance to *Ralstonia solanacearum* in transgenic tobacco plants. *Phytopathology* 88, 730-734; Chong, D. K. y Langridge, W. H. (2000). Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. *Transgenic Research* 9, 71-78]. En la actualidad existen ejemplos de péptidos derivados de LF en fase avanzada de desarrollo para su utilización como fármacos [Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395]. En concreto, las Lactoferricinas (Lfcin) son péptidos aislados de la región N-terminal de LF por digestión con pepsina, los cuales presentan propiedades antimicrobianas [Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., y Tomita, M. (1992). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1121, 130-136; WO2004/089986, Antimicrobial peptide from transferrin family]. La estructura primaria de la lactoferricina bovina (LfcinB) corresponde a los residuos 17-41 de LF y tiene potente actividad antimicrobiana [Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., y Tomita, M. (1992). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1121, 130-136; Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., y Hayasawa, H. (2002). Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochemistry and Cell Biology* 80, 109-112].

En la presente invención se describe la secuencia de aminoácidos de un péptido de quince residuos de aminoácidos derivado de Lactoferricina bovina, distinto de los mencionados anteriormente, previamente descrito como antimicrobiano [Strom, M. B., Rekdal, O., y Svendsen, J. S. (2000). Antibacterial activity of 15-residue lactoferricin derivatives. *Journal of Peptide Research* 56, 265-274; Strom, M. B., Haug, B. E., Rekdal, O., Skar, M. L., Stensen, W., y Svendsen, J. S. (2002). Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity. *Biochemistry and Cell Biology* 80, 65-74] y ahora caracterizado en la presente invención 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 (HHL, Hipuril-Histidil-Leucina) y naturales (angiotensina I) mediada por ECA, y en ensayos realizados *ex vivo*, midiendo la disminución de la contracción de arterias carótidas de conejo inducida por exposición a angiotensina I.

Breve descripción de la invención

La presente invención está relacionada con los sectores farmacológico y de la industria agroalimentaria y consiste en la identificación y caracterización de un péptido de quince residuos de aminoácidos (llamado LfcinB17-31; SEQ ID NO 1), y de otro que es una versión reducida del mismo (llamado LfcinB20-25, SEQ ID NO 2), como inhibidores efectivos de la enzima convertora de la angiotensina (ECA) que se halla implicada en la formación del compuesto angiotensina II que es un vasoconstrictor responsable, entre otras causas/mecanismos, de la hipertensión. Dicho péptido SEQ ID NO 1 deriva de la secuencia de la proteína LF bovina, de origen natural. La actividad inhibidora 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 del péptido se corresponde con una secuencia de aminoácidos característica, ya que otros pequeños péptidos 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 arteria carótida de conejo.

Descripción detallada de la invención

En la presente invención se describe la identificación y caracterización de dos péptidos con actividad de inhibición de la enzima convertora de angiotensina (ECA), implicada en los mecanismos de control de la presión arterial. En un ejemplo particular, se describe su utilización como inhibidor de ECA mediante el empleo de sustratos artificiales como el Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) o 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 quince aminoácidos característica: el primero de quince aminoácidos SEQ ID NO 1 y el segundo de seis aminoácidos SEQ ID NO 2 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, dicho péptido se sintetizó químicamente con los estereoisómeros L- naturales de los aminoácidos y seguidamente se purificó, 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].

En la presente invención se describen ensayos experimentales que ilustran la actividad de SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2, en condiciones experimentales *in vitro*, utilizando ECA purificada de riñón de cerdo y dos sustratos distintos, uno artificial denominado HHL y otro natural como es la angiotensina I. El primero de los sustratos permite llevar a cabo una serie de ensayos encaminados a conocer la capacidad inhibidora del péptido, mientras que el segundo permite contrastar los resultados obtenidos con el anterior y además comprobar dicha capacidad inhibidora de ECA en el caso de utilizar sustratos naturales. Como prueba de la especificidad de la inhibición, en la presente invención también se describe la ausencia de actividad *in vitro* de otros tres péptidos (SEQ ID NO3 péptido P20D; SEQ ID NO4, péptido P26D; y SEQ ID NO5, péptido P36D; Figura 1) de secuencia relacionada, pero distinta a la de los dos inhibidores descritos.

La actividad inhibidora de los péptidos 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.

La actividad inhibidora del péptido descrito en la presente invención también se manifiesta con una reducción de la contracción ECA-dependiente de arteria carótida de conejo, inducida mediante la adición de angiotensina I en ensayos *ex vivo*.

Considerando las propiedades del péptido descrito en la presente invención, es obvio para todo aquel experto en el tema su potencial utilización como aditivo alimentario, compuesto o fármaco de utilidad en la prevención o frente a enfermedades que tengan como causa o 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 de organismos, que pueden ser utilizadas para la producción y utilización del péptido descrito en la presente invención y sus derivados para los fines descritos.

Breve descripción de la figuras

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de los péptidos utilizados en la descripción de la presente invención, incluyendo los péptidos LfcinB20-25 SEQ ID NO 2y LfcinB17-31 SEQ ID NO 1 descritos en la presente invención como inhibidores de la enzima convertora de angiotensina I. Los aminoácidos se representan por sus códigos de tres letras, y en la parte superior se muestra su numeración. Los péptidos sintetizados químicamente tenían sus extremos protegidos mediante acetilación (Ac-) en el caso del extremo amino terminal y amidación (Am-) en el caso del extremo carboxi terminal, siguiendo procedimientos habituales para toda aquella persona experta en el área de conocimiento de la presente invención.

Figura 2. Efecto de la concentración del péptido LfcinB17-31 SEQ ID NO 1 (en unidades micromolar, μM) sobre la actividad *in vitro* de la enzima convertora de angiotensina I (medida como actividad residual o porcentaje de la actividad de la reacción control sin péptido añadido) cuando utiliza su sustrato natural angiotensina I. Cada punto representa la media de actividad residual \pm desviación estándar de cuatro determinaciones independientes, para cada concentración de péptido. La curva representa el mejor ajuste a una curva sigmoideal de cuatro parámetros (coeficiente de regresión, $r = 0,9749$) que permitió calcular un EC_{50} de $25,5 \pm 4,5 \mu\text{M}$ ($p < 0,0001$) (Programa informático SigmaPlot v 8.0).

Figura 3. Registro de tensión isométrica de un experimento representativo en el que se muestra el efecto inhibitor del péptido LfcinB17-31 SEQ ID NO 1 (a una concentración de $20 \mu\text{M}$) sobre la contracción ECA-dependiente inducida por angiotensina I ($1 \mu\text{M}$) en un segmento de arteria carótida de conejo. El experimento va precedido por una contracción con solución despolarizante (KCl) para comprobar la viabilidad de la preparación.

Un ejemplo de realización de la invención

1. *Síntesis de péptidos.* Los péptidos descritos y analizados en la presente invención (Figura 1) se sintetizaron químicamente sobre fase sólida siguiendo procedimientos habituales que utilizan el grupo N-(9-fluorenyl) methoxycarbonyl (Fmoc) para la protección del grupo α -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 P20D SEQ ID NO 3, P26D SEQ ID NO 4 y P36D SEQ ID NO 5 se diseñaron y utilizaron como controles negativos en los ensayos descritos a continuación. El extremo N-terminal de los péptidos se encuentra acetilado (Ac) y el extremo C-terminal amidado (Am), 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*).

También es posible la Producción de los péptidos 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. P., Aluko, R. E., y Muir, A. D. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A* 950, 125-130]. La mezcla de reacción tiene un volumen de 225 μ l y está constituida por 50 μ l de HHL 25 mM en tampón Tris HCl 200 mM pH 8.3 con NaCl 600 mM y ZnCl₂ 10 μ M, 75 μ l de una solución de ACE en el mismo tampón que corresponden a 1.5 mU de actividad, y 100 μ l 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 preincubaban 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 μ l 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 como actividad residual de las determinaciones de actividad ACE en presencia de cada uno de los péptidos, pudiéndose observar una inhibición significativa para los péptidos LfcinB20-25 SEQ ID NO 2 y LfcinB17-31 SEQ ID NO 1 pero no para los controles negativos.

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 20 μ g). 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 como actividad residual de las determinaciones de actividad ACE en presencia de cada uno de los péptidos, y ponen de manifiesto una mayor inhibición en el caso de los péptidos LfcinB20-25 SEQ ID NO 2 y LfcinB17-31 SEQ ID NO 1.

4. *Ensayos in vitro de inhibición de la actividad ECA sobre el sustrato natural angiotensina I para el cálculo del IC₅₀*. El protocolo experimental descrito en el apartado anterior se repitió empleando diferentes concentraciones de péptido LfcinB17-31; SEQ ID NO 1: 0,1; 2,5; 5; 10; 20; 40 y 80 μ M. Se efectuaron cuatro 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 péptido ensayadas se muestra en la figura 2.

A partir de estos resultados se calculó la concentración de LfcinB17-31 que inhibe al 50% la actividad ECA sobre angiotensina I (IC₅₀), siendo el valor obtenido 25,5 \pm 4,5 μ M (media aritmética \pm desviación estándar de la media).

5. *Ensayos ex vivo de inhibición de la contracción de arterias aisladas*. Para los ensayos *ex vivo* se utilizó el péptido LfcinB17-31 SEQ ID NO 1 por ser el que había presentado mayor actividad inhibitoria en los ensayos *in vitro* realizados anteriormente. La preparación experimental consistió en obtener segmentos cilíndricos (3 mm) de arterias aisladas (arteria 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 [Salom, J. B., Burguete, M. C., Pérez-Asensio, F. J., Centeno, J. M., Torregrosa, G., y Alborch, E. (2002). Acute relaxant effects of 17- β -estradiol through non-genomic mechanisms in rabbit carotid artery. *Steroids* 67, 339-346]. 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% O₂ y 5% CO₂ que le confiere un pH de 7,3-7,4. Los experimentos comienzan tras un periodo de 30-60 minutos necesario para alcanzar la estabilización en el tono pasivo de 2 g. 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 μ M). Tras preincubar los segmentos durante 20 minutos con el péptido SEQ ID NO 1 (20 μ M) objeto de estudio, se indujo una segunda contracción con Angiotensina I. La Figura 3 refleja el registro de uno de estos experimentos. Como control, se dejaron algunos segmentos sin preincubar con péptido alguno. La Tabla 3 muestra el resumen estadístico de todos los experimentos realizados y pone de manifiesto un efecto inhibitorio significativo de SEQ ID NO 1 sobre la contracción de arteria carótida inducida por el tratamiento con angiotensina I.

ES 2 321 358 B1

TABLA 1

Efecto de distintos péptidos sobre la actividad in vitro de ECA sobre el sustrato artificial HHL

5 Se indican los porcentajes de actividad residual de la ECA -con respecto al control sin péptido añadido (valor 100)- para una concentración de péptido en el ensayo de 20 μ M, expresándose estos valores como la media \pm desviación estándar de un número de repeticiones independientes (indicado entre paréntesis). Los valores seguidos de la misma letra minúscula no difieren entre sí con una confianza del 99% (Test de separación de medias HSD de Tukey). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la actividad del control sin péptido (Test de la t-Student) 10 con una confianza del 99% (* $p < 0,01$) o del 99,9% (** $p < 0,001$).

Péptido	Actividad Residual (%)
LfcinB17-31 (20 μ M) SEQ ID NO 1	62 \pm 6 (4) (c) *
LfcinB20-25 (20 μ M) SEQ ID NO 2	71 \pm 8 (6) (c) **
P20D (20 μ M) SEQ ID NO 3	133 \pm 19 (3) (a)
P26D (20 μ M) SEQ ID NO 4	101 \pm 7 (4) (b)
P36D (20 μ M) SEQ ID NO 5	103 \pm 14 (7) (b)

TABLA 2

Efecto de distintos péptidos sobre la actividad in vitro de ECA sobre el sustrato natural angiotensina I

40 Se indican los porcentajes de actividad residual de la ECA -con respecto al control sin péptido añadido (valor 100)- para una concentración de péptido en el ensayo de 20 μ M, expresándose estos valores como la media \pm desviación estándar de un número de repeticiones independientes (indicado entre paréntesis). Los valores seguidos de la misma letra minúscula no difieren entre sí con una confianza del 99% (Test de separación de medias HSD de Tukey). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a la actividad del control sin péptido (Test de la t-Student) 45 con una confianza del 99% (* $p < 0,01$) o del 99,9% (** $p < 0,001$).

Péptido	Actividad Residual (%)
LfcinB17-31 (20 μ M) SEQ ID NO 1	59 \pm 11 (7) (c) **
LfcinB20-25 (20 μ M) SEQ ID NO 2	66 \pm 6 (4) (bc) *
P20D (20 μ M) SEQ ID NO 3	85 \pm 8 (4) (ab)
P36D (20 μ M) SEQ ID NO 5	88 \pm 10 (7) (a)

ES 2 321 358 B1

TABLA 3

Efecto inhibidor del péptido SEQ ID NO 1 descrito en la presente invención como inhibidor de ECA sobre la contracción ECA-dependiente con angiotensina I en arterias aisladas de conejo

5 Los resultados indican la contracción de la arteria en respuesta al tratamiento con angiotensina I (1 μ M), en % respecto a una respuesta previa en el mismo segmento arterial, y se expresan como la media \pm desviación estándar de la determinación sobre (n) segmentos arteriales. El control se realizó sin adición de péptido. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto al control (Test de la t-Student) con una confianza del 99% (** p<0,01).

10

	Contracción (%)
Control	86 \pm 17 (27)
LfcinB17-31 (20 μ M) SEQ ID NO 1	68 \pm 18 (10) **

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de péptidos bioactivos de secuencia SEQ ID NO 1, o un fragmento activo de la misma de secuencia SEQ ID NO 2, para la preparación de formulaciones inhibitoras de la enzima convertora de angiotensina I (ECA) útiles en la reducción de la hipertensión.

10 2. Uso de péptidos bioactivos, según reivindicación 1, **caracterizado** porque la formulación elaborada es un aditivo, ingrediente o suplemento alimentario funcional.

3. Uso de un péptidos bioactivos, según reivindicación 1, **caracterizado** porque la formulación elaborada es una composición farmacéutica.

15 4. Uso de un péptidos bioactivos, según reivindicación 1, **caracterizado** porque la formulación elaborada es un nutracéutico.

5. Uso de un péptidos bioactivos, según reivindicación 1, **caracterizado** porque la formulación elaborada es un nuevo alimento.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

P20D	1	2	3	4	5	6									
SEQ ID NO 3	Ac-{d-Arg}{d-Lys}{d-Tyr}{d-Trp}{d-Phe}{d-Trp}-Am														
P26D	1	2	3	4	5	6									
SEQ ID NO 4	Ac-{d-Arg}{d-Lys}{d-Lys}{d-Trp}{d-Phe}{d-Trp}-Am														
P36D	1	2	3	4	5	6									
SEQ ID NO 5	Ac-{d-Arg}{d-Lys}{d-Trp}{d-Arg}{d-Phe}{d-Trp}-Am														
LfcinB20-25	1	2	3	4	5	6									
SEQ ID NO 2	Ac-{Arg}{Arg}{Trp}{Gln}{Trp}{Arg}-Am														
LfcinB17-31	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
SEQ ID NO 1	Ac-{Phe}{Lys}{Cys}{Arg}{Arg}{Trp}{Gln}{Trp}{Arg}{Met}{Lys}{Lys}{Leu}{Gly}{Ala}-Am														

Figura 1

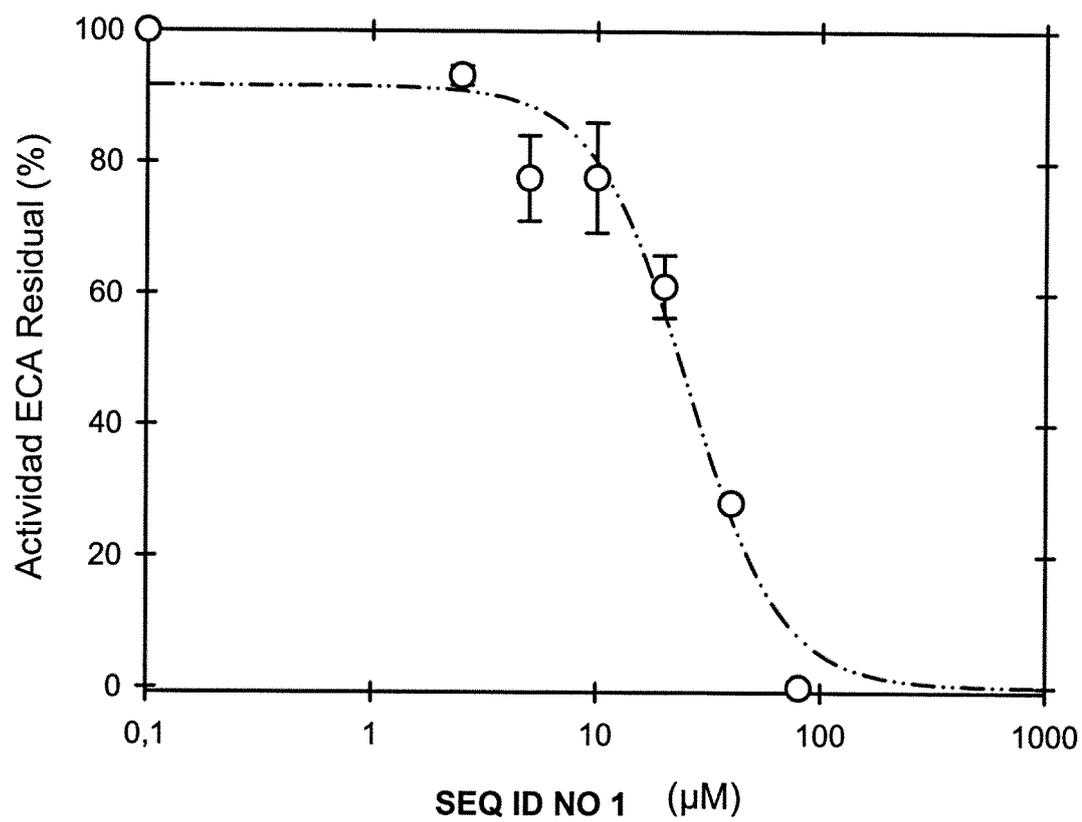


Figura 2

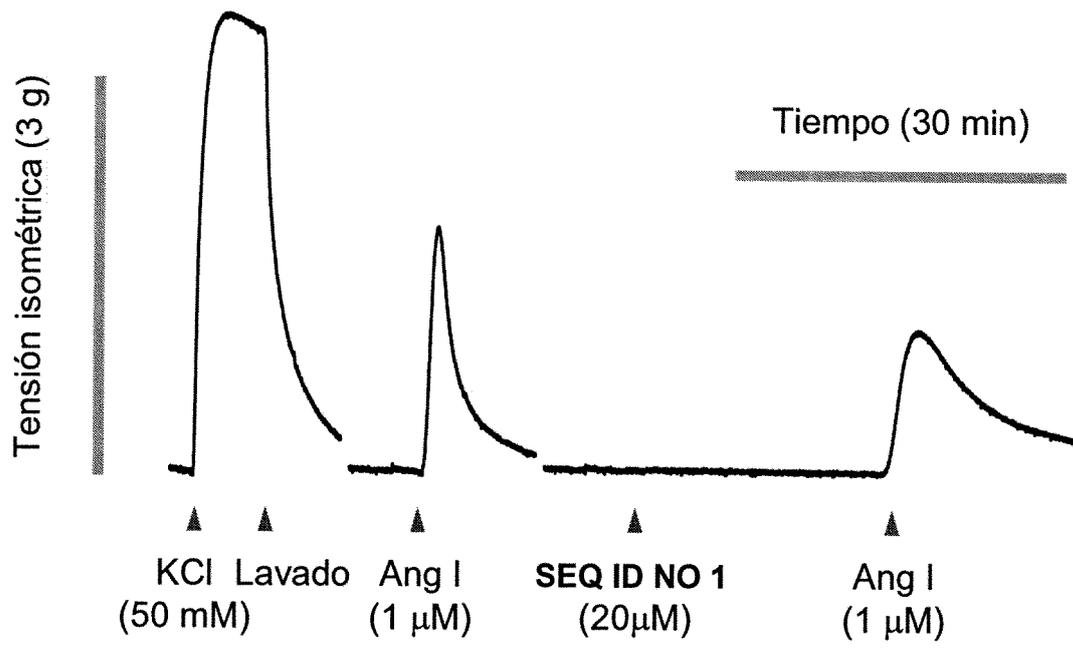


Figura 3

ES 2 321 358 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas Universidad de Valencia
Fundación para la Investigación del Hospital de la Fé de Valencia
5 Manzanares Mir, Paloma
Marcos López, José Francisco
Enrique López, María
Vallés Alventosa, Salvador
Centeno Guil, Jose María
10 Salom Salvenero, Joan Bta
Torregrosa Bernabé, Germán
Alborch Domínguez, Enrique
- <120> PEPTIDOS DERIVADOS DE UNA PROTEINA LACTEA CON ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ENZIMA
15 CONVERTORA DE LA ANGIOTENSINA I
- <130> LfcinB
- 20 <160> 5
- <170> PatentIn version 3.3
- 25 <210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> *Bos taurus*
30 <400> 1
- 35 Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala
1 5 10 15
- <210> 2
40 <211> 6
<212> PRT
<213> *Bos taurus*
- 45 <400> 2
- Arg Arg Trp Gln Trp Arg
1 5
- 50 <210> 3
<211> 6
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial
- <400> 3
- 60 Arg Lys Tyr Trp Phe Trp
1 5
- <210> 4
65 <211> 6
<212> PRT

ES 2 321 358 B1

<213> Secuencia Artificial

<400> 4

5 Arg Lys Lys Trp Phe Trp
 1 5

10 <210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<400> 5

20 Arg Lys Trp Arg Phe Trp
 1 5

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 321 358

② Nº de solicitud: 200600881

③ Fecha de presentación de la solicitud: **05.04.2006**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 38/55** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MURDOCK, C.A. "Antibacterial activity of pepsin-digested lactoferrin on foodborne pathogens in buffered broth systems and ultra-high temperature milk with EDTA". JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY. Noviembre 2002. Vol. 93, N°. 5, páginas 850-856, todo el documento.	1-5
A	FACON, M.J. et al. "Antibacterial activity of Lactoferricin, lysozyme and EDTA against Salmonella enteritidis". INT. DAIRY JOURNAL. Marzo 1996. Vol. 6, N°. 3, páginas 303-312, todo el documento.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

20.05.2009

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1