

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 954**

21 Número de solicitud: 201531372

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/01 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

25.09.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.03.2017

71 Solicitantes:

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI (100.0%)
Escorxador, s/n
43003 TARRAGONA ES

72 Inventor/es:

BRAVO VÁZQUEZ, Francisca Isabel;
AROLA FERRER, Lluís y
MUGUERZA MARQUÍNEZ, María Begoña

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE UN HIDROLIZADO DE GARRAS DE PATA DE POLLO CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA, HIDROLIZADO OBTENIDO Y PÉPTIDOS QUE CONTIENE**

57 Resumen:

La presente invención es un procedimiento para la obtención de un hidrolizado enzimático con actividad antihipertensiva que comprende la trituración de garras de pata de pollo y liofilización para obtener un material en polvo de un tamaño de partícula <2 mm; ajustar una disolución acuosa de este polvo a un pH distinto en un valor de 0,5 respecto del pH del polvo de partida y calentar entre 80 y 120°C durante entre 10 y 120 min; enfriar la disolución anterior a una temperatura entre 45 y 55°C y realizar una hidrólisis enzimática durante un tiempo de entre 1 y 24 h, con enzimas seleccionadas evaluando y seleccionando la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina. La invención es también el uso del hidrolizado que se obtiene en el tratamiento de hipertensión, y la utilidad farmacológica de los péptidos que contiene el hidrolizado.

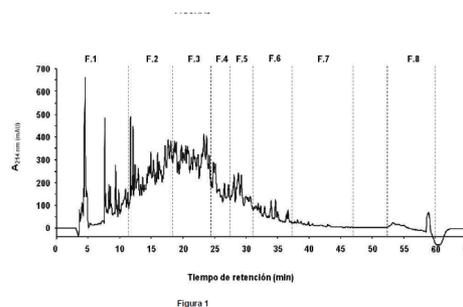


Figura 1

**PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE UN HIDROLIZADO DE GARRAS DE
PATA DE POLLO CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA, HIDROLIZADO
OBTENIDO Y PEPTIDOS QUE CONTIENE**

5

SECTOR TÉCNICO

El hidrolizado de garras de pollo de la presente invención es de utilidad en el tratamiento de la hipertensión, en el campo de la medicina o de la industria alimentaria. Los péptidos encontrados pueden ser de utilidad en dietética como suplementos de productos alimenticios.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El término antihipertensivo designa toda sustancia o procedimiento que reduce la presión arterial (PA). Se conocen varios agentes antihipertensivos eficaces que se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción. Se identifican así diuréticos, bloqueadores adrenérgicos beta, bloqueadores de los canales del calcio, inhibidores adrenérgicos centrales y periféricos, inhibidores de los receptores de la angiotensina o los inhibidores de la Enzima Convertidora de la Angiotensina (ECA). La ECA cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II, que es una hormona vasoconstrictora.

15

20

Los inhibidores de la ECA, o actividad inhibidora de la ECA (IECA), interfieren en la producción de angiotensina II por el bloqueo de la enzima que la produce. Tal efecto no sólo reduce la PA sino que disminuye el daño vascular provocado por la hipertensión, lo que a su vez disminuye la incidencia de complicaciones en el paciente, en particular insuficiencia renal o insuficiencia cardíaca. Sin embargo, la experiencia muestra que no se puede establecer una correlación directa a priori entre observar una actividad IECA *in vitro* y obtener un efecto antihipertensivo *in vivo* correlativo en pacientes.

25

30

La publicación WO 2007004876 A2 describe la secuencia de varios péptidos con actividad IECA *in vitro* obtenidos de un hidrolizado de proteínas de la leche. Los péptidos tienen una longitud de 2 a 14 aminoácidos y al menos uno de ellos presenta una identidad de secuencia del 66,7% con el péptido identificado por la SEQ.ID.NO: 1 de la presente invención. Esta identidad es muy baja para poder establecer una

35

relación entre los dos péptidos, lógicamente porque los dos sustratos son muy diferentes.

5 La solicitud WO 2007108554 A1 describe la obtención a partir de colágeno de pollo de un hidrolizado enzimático con actividad IECA que muestra también propiedades antihipertensivas. Identifica un péptido de 3000 Da con dicha actividad. Sin embargo, utilizar sólo colágeno como material de partida excluye una serie de proteínas presentes en la piel de las garras del animal que sí se incorporan en el hidrolizado de la presente invención. También excluye proteínas diferentes al colágeno presentes en
10 otros tejidos de las garras de pata de pollo, como el cartílago, huesos o uñas. Los péptidos obtenidos en la presente invención van a ser pues distintos.

JP H42 64098 A describe la obtención de un hidrolizado de una proteína de carne magra de pollo tratada con termolisina que presenta actividad IECA *in vitro*. Al tratarse
15 de carne magra de pollo, en el producto de partida predominarán proteínas típicas de tejido muscular, casi completamente ausentes en las garras de pollo y por tanto diferentes de las de la presente invención. Quedan de nuevo excluidas otras proteínas mayoritarias de este sustrato. En el hidrolizado obtenido, el documento identifica el péptido identificado por la SEQ.ID.NO:10 como agente activo, que no guarda ninguna
20 identidad con los péptidos de la invención.

Cheng describe un hidrolizado con actividad antihipertensiva obtenido de la hidrólisis de la pata de pollo completa con alcalasa (Cheng, F. y col. "Determination of angiotensine-I converting enzyme inhibitory peptides in chicken leg bone protein
25 hydrolysate with alcalase". 2009. Anim. Sci. J. 80, 91-97). El procedimiento incluye someter al material de partida licuado a un tratamiento térmico en "baño María" previo al tratamiento con el enzima. Se obtienen 10 péptidos de entre 5 y 10 aminoácidos con dicha actividad IECA *in vitro*, ninguno de los cuales presenta sin embargo una homología significativa con los péptidos de la invención; de nuevo porque el sustrato
30 utilizado por Cheng incluye hueso y sobre todo tejido muscular, y quedan excluidos compuestos mayoritarios de las garras de pollo. Los péptidos obtenidos por la digestión de este sustrato con alcalasa son lógicamente distintos, de forma que el procedimiento no sugiere los resultados obtenidos por la presente invención.

El documento de la técnica que se considera más cercano a la invención es la solicitud TW 201106955 A. Este documento describe la preparación de un hidrolizado enzimático con actividad antihipertensiva a partir de las garras de pollo tomatero. El procedimiento de obtención comprende la homogeneización del material de partida y un tratamiento térmico en “baño María” seguido de una digestión con proteasa N. Después de la digestión por la proteasa se filtra el producto obtenido, se liofiliza y se seleccionan aquellos hidrolizados que muestran actividad IECA. Sin embargo, el producto obtenido por la proteasa N es distinto del obtenido por las proteasas de la invención. La diferencia fundamental respecto de la presente invención es que el pretratamiento térmico en esta última se realiza a pH modificado. Esta modificación en el procedimiento no está sugerida por el arte previo.

Según el mejor conocimiento del Solicitante los péptidos de la invención no han sido descritos como tales en la técnica. Solamente el identificado por la SEQ.ID.NO.ID:2 está descrito en varias publicaciones, aunque siempre formando parte de secuencias más extensas. Varias de estas secuencias están relacionadas con el tratamiento de la angiogénesis por ejemplo en la solicitud US 2012101029 A1, que contiene en su SEQ.ID.NO:18 el péptido de la invención. Sin embargo, estos documentos no describen ni sugieren que se puedan considerar fragmentos de las secuencias más extensas, ni en particular un fragmento que pueda corresponder con el péptido de la invención.

El problema que se plantea pues en la técnica es la obtención de un hidrolizado alternativo de proteínas efectivo para el tratamiento de la hipertensión. La solución propuesta por la presente invención es un hidrolizado obtenido a partir de un procedimiento modificado de hidrólisis de un sustrato de garras de pollo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención es un procedimiento para la obtención de un hidrolizado enzimático con actividad antihipertensiva que comprende la trituración de garras de pata de pollo y liofilización para obtener un material en polvo de un tamaño de partícula <2 mm, ajustar una disolución acuosa de este polvo a un pH entre 3 y 10 con la condición de que es valor de pH sea distinto del correspondiente al material en polvo en al menos un valor de 0,5, y calentar entre 80 y 120°C durante entre 10 y 120 min, preferiblemente entre 60 y 90 min, enfriar la disolución anterior a una temperatura

entre 45 y 55°C y realizar una hidrólisis enzimática durante un tiempo de entre 1 y 24 h, preferiblemente entre 2 ó 24 h, más preferiblemente 2 ó 24 h, con enzimas seleccionadas entre el grupo compuesto por:

- 5 - enzimas proteolíticas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* identificadas como E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28,
- una serinproteasa de *Bacillus licheniformis* identificada como E.C. 3.4.21.62,
- una metaloproteasa dependiente de Zinc de *Bacillus amyloliquefaciens* identificada como E.C. 3.4.24,
- 10 - una aminopeptidasa de *Aspergillus oryzae* identificada como E.C. 3.4.11.1, y
- una mezcla entre ellas,

evaluando la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina según el método descrito en Sentandreu, MN y Toldrá F. 2006. Food Chem. 97, 546-554, y la
15 selección de un hidrolizado con actividad > 80% en dilución acuosa al 50% v/v a partir de la evaluación anterior.

En el ámbito de la presente solicitud, cuando se dice que el pH de la disolución acuosa de la invención es distinto del correspondiente al material en polvo en al menos un
20 valor de 0,5, se refiere a que es distinto del pH del material el polvo medido también en disolución acuosa. Evidentemente, esta última medición puede realizarse sobre una disolución para tal fin o en la disolución que luego se va a ajustar de acuerdo al procedimiento de la invención.

25 En un aspecto preferible, las enzimas utilizadas en la hidrólisis son enzimas proteolíticas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, e identificadas como E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28.

En un aspecto más restrictivo, la invención consiste en el procedimiento anterior.

30

En un aspecto muy preferible, la invención es un procedimiento que comprende triturar garras de pata de pollo y liofilizar para obtener un material en polvo con tamaño de partícula <2 mm, ajustar una disolución acuosa de este polvo a un pH de 7,5 en que este valor de pH es distinto del correspondiente al material en polvo de la etapa
35 anterior en al menos 0,5, calentar a 100°C durante 90 min, enfriar la disolución anterior

a una temperatura de 50°C e hidrolizar durante un tiempo de 2 ó 24 h con enzimas proteolíticas obtenidas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* identificadas como E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28, evaluación de la actividad inhibidora de enzima convertidora de angiotensina según el método descrito en Sentandreu, MN y Toldrá F. 2006. Food Chem. 97,546-554, y la selección de un hidrolizado con actividad >80% en dilución acuosa al 50% v/v a partir de la evaluación anterior.

La materia prima son las Garras de Patas de Pollo (GPP), que es un subproducto de la industria cárnica. El proceso de producción del hidrolizado es barato y fácil de industrializar.

El aspecto inventivo del procedimiento de la invención es el pretratamiento del polvo de GPP a pH modificado para lograr la máxima solubilización y desnaturalización de la proteína, lo que optimiza su posterior hidrólisis. Este pretratamiento facilita el acceso de las enzimas a las proteínas.

La elección de la enzima de hidrólisis en el procedimiento de la invención resulta determinante. Entre las innumerables enzimas que se pueden utilizar ninguna estaba particularmente sugerida en la técnica. De forma aleatoria, la presente invención eligió Protamex® (Novozyme) que en la fecha de la presente solicitud son las enzimas proteolíticas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* (E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28); Alcalase® 2,4 L, también denominada subtilisina Carlsberg, que es una serinproteasa de *Bacillus licheniformis* (E.C. 3.4.21.62); Neutrase® 0,8L que es una metaloproteasa dependiente de Zinc de *Bacillus amyloliquefaciens* (E.C. 3.4.24); y Flavourzyme® que es una aminopeptidasa de *Aspergillus oryzae* (E.C. 3.4.11.1) (Novozyme, Nordisk). Un aspecto de la invención también comprendería una mezcla de todas ellas.

Muchos de los hidrolizados obtenidos mostraron una buena actividad IECA y 3 de ellos una clara actividad antihipertensiva. En particular, la actividad antihipertensiva del hidrolizado obtenido con Protamex®, denominado en la presente solicitud como hidrolizado 1, fue sorprendentemente alta, lo cual representa una ventaja tecnológica definitiva con respecto de la técnica.

La invención también son los hidrolizados que se obtienen. De forma que otro aspecto muy preferible es un hidrolizado enzimático que comprende los péptidos identificados por las SEQ.ID.NO:1-9, sus estereoisómeros y/o sales de los mismos. Otro aspecto preferible es el uso de este hidrolizado enzimático en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la hipertensión en un sujeto. O también, el hidrolizado para uso en el tratamiento de la hipertensión en un sujeto. El sujeto es preferiblemente humano.

Un aspecto preferible más es una composición farmacéutica en forma líquida o jarabe que comprende un hidrolizado enzimático que contiene los péptidos identificados por SEQ.ID.NO:1-9, sus estereoisómeros y/o sales de los mismos, y excipientes farmacéuticamente aceptables.

A partir de los hidrolizados de la invención se obtuvieron una serie de péptidos bioactivos. En particular, los péptidos identificados por la SEQ.ID.NO:2 y 4 mostraron actividad IECA *in vitro* y además una actividad antihipertensiva sorprendente.

De forma que otro aspecto preferible de la invención es un péptido identificado por una de las secuencias SEQ.ID.NO:1-9. Otro aspecto más preferible es el uso de un péptido identificado por las SEQ.ID.NO:2 ó 4, sus estereoisómeros y/o sales de los mismos, o su combinación en la preparación de un medicamento para el tratamiento de hipertensión. O también, los péptidos identificados por las SEQ.ID.NO:2 ó 4, sus estereoisómeros y/o sales de los mismos, o su combinación para uso en el tratamiento de hipertensión.

Otra realización muy preferible son los péptidos identificados por las SEQ.ID.NO:2 ó 4, sus estereoisómeros y/o sales de los mismos, o su combinación para uso como medicamento.

Otro aspecto muy preferible es una composición farmacéutica que comprende un péptido identificado por la secuencia SEQ.ID.NO:2 ó 4, sus estereoisómeros y/o sales de los mismos o su combinación, y excipientes farmacéuticamente aceptables. Un aspecto preferible más es un suplemento alimenticio que comprende un péptido identificado por la secuencia SEQ.ID.NO:2 ó 4, sus estereoisómeros y/o sales de los mismos o su combinación, y aditivos alimentarios.

Los resultados del Ejemplo 2 muestran cómo el pretratamiento en el procedimiento de obtención afecta a la actividad IECA de los hidrolizados, haciendo que en la mayoría de los casos aumente y con frecuencia con valores superiores al 80%. Este pretratamiento no resulta excesivamente costoso ya que no emplea temperaturas demasiado altas.

La determinación del IC₅₀ de los hidrolizados mostró que la hidrólisis proteica con la enzima Protamex[®] producía hidrolizados con menores valores de IC₅₀ a todos los tiempos de hidrólisis, es decir, con más potente actividad IECA y por lo tanto con mayor potencial antihipertensivo. Los resultados de las Tablas I y II muestran que el pH utilizado en el pretratamiento, y no solamente la temperatura, influye en la actividad IECA. El tratamiento con modificación de pH mejora la extracción de las proteínas y también aumenta su grado de desnaturalización, condicionando así la hidrólisis posterior.

Además, se ha descartado que el hidrolizado antihipertensivo presente actividad hipotensiva mediante un estudio *in vivo* en el que se utilizaron ratas normotensas (Wistar-Kyoto) y a las que se les administró un hidrolizado de la invención, como se muestra en el Ejemplo 7. Esta actividad hipotensiva no es una actividad deseable ya que es la bajada de la PA de una persona o animal sano, mientras que la actividad antihipertensiva es la disminución de la PA en una persona u animal hipertenso. Resulta de gran importancia que el hidrolizado de la invención muestre un efecto terapéutico en las personas enfermas y no en las sanas.

De entre los péptidos de la presente invención, el identificado por la SEQ.ID.NO:7 presenta los valores de actividad IECA más bajos (IC₅₀= 7,06 µg/mL) lo cual podría indicar un posible efecto antihipertensivo; sin embargo no resultó así debido probablemente a que el péptido se hidroliza por las enzimas del tracto digestivo y no puede absorberse como tal. De manera similar sucedió con el péptido SEQ.ID.NO:1, que a pesar de tener una actividad IECA mejor a la mostrada por el péptido SEQ.ID.NO:4 no presentó actividad antihipertensiva. Los resultados mostrados en la presente solicitud demuestran que una actividad IECA potente no se corresponde de forma directa con un efecto de disminución de la PA.

De cualquier forma, en la actividad antihipertensiva del hidrolizado no se descarta que los péptidos que de forma individual no muestran actividad antihipertensiva, por ejemplo la SEQ.ID.NO:1 y 7, puedan actuar de forma sinérgica al administrarlos conjuntamente con el resto de péptidos contribuyendo a la bajada de la PA atribuible al hidrolizado antihipertensivo de la invención.

De hecho, se ha descrito que el grado de hidrólisis producido por la digestión fisiológica de un determinado péptido, además de depender de su tamaño y de su naturaleza, también depende de la presencia de otros péptidos en el medio (FitzGerald y col., "Hypotensive peptides from milk proteins". 2004. J. Nutr. 134(4), 980S – 988S). Esto podría hacer que los péptidos que de forma individual no presentan actividad antihipertensiva no pierdan su bioactividad al administrarse de forma conjunta con otros péptidos.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un cromatograma de HPLC en fase reversa a escala semipreparativa del sobrenadante activo que se obtiene tras la centrifugación y ultrafiltración, a través de una membrana de 3.000 Da de tamaño de poro, del hidrolizado 1 obtenido por hidrólisis enzimática con Protamex[®], 2h, a 50°C a partir de polvo de GPP. F.1 – F.8 corresponden a las ocho (8) fracciones recogidas.

La Figura 2 son dos cromatogramas de HPLC en fase reversa a escala semipreparativa de las dos (2) fracciones más activas (F.3 (A) y F.6 (B)) que se obtuvieron de la primera separación por HPLC del hidrolizado 1 de polvo de GPP, y el fraccionamiento realizado en cada una de ellas. En concreto, se recogieron seis (6) subfracciones de la F.3 (F.3.1-F.3.6) y ocho (8) subfracciones de la F.6 (F.6.1-F.6.8).

La Figura 3A es una gráfica que muestra la disminución de la presión arterial sistólica (PAS) obtenida en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) a las que se administra 1,5 mL de agua (●), 5 mL/kg del hidrolizado 1 de polvo de GPP (Protamex[®], 2h, a 50°C) (▲), o 50 mg/kg de Captopril (■), en función del tiempo pasado tras la administración. Los datos representan la media ± ESM para un mínimo de seis (6) animales. Salvo indicación en contrario, todas las dosis indicadas en la presente solicitud se refieren al peso corporal del animal.

La **Figura 3B** es una gráfica que muestra la disminución de la presión arterial diastólica (PAD) obtenida en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) a las que se administra 1,5 mL de agua (●), 5 mL/kg del hidrolizado 1 de polvo de GPP (Protamex[®], 2h, a 50°C) (▲), o 50 mg/kg de Captopril (■), en función del tiempo pasado tras la administración. Los datos representan la media ± ESM para un mínimo de seis (6) animales.

La **Figura 4A** es una gráfica que muestra la disminución de la presión arterial sistólica (PAS) obtenida en ratas normotensas Wistar-Kyoto (WKY) que son el control normotenso de las ratas SHR a las que se administra 1,5 mL de agua (●) o 5 mL/kg de hidrolizado 1 de polvo de GPP (Protamex[®], 2h, a 50°C) (▲), en función del tiempo pasado tras la administración. Los datos representan la media ± ESM para un mínimo de seis (6) animales.

15

La **Figura 4B** es una gráfica que muestra la disminución de la presión arterial diastólica (PAD) obtenida en ratas normotensas Wistar-Kyoto (WKY) que son el control normotenso de las ratas SHR a las que se administra 1,5 mL de agua (●) o 5 mL/kg de hidrolizado 1 de polvo de GPP (Protamex[®], 2h, a 50°C) (▲), en función del tiempo pasado tras la administración. Los datos representan la media ± ESM para un mínimo de seis (6) animales.

20

La **Figura 5A** es una gráfica que muestra la disminución de la presión arterial sistólica (PAS) obtenida en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) a las que se administra 1,5 mL de agua (◆), 5 mL/kg del hidrolizado 2 de polvo de GPP (Protamex[®], 24h, a 50°C) (●), o 50 mg/kg de Captopril (■), en función del tiempo pasado tras la administración. Los datos representan la media ± ESM para un mínimo de seis (6) animales.

25

La **Figura 5B** es una gráfica que muestra la disminución de la presión arterial diastólica (PAD) obtenida en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) a las que se administra 1,5 mL de agua (◆), 5 mL/kg del hidrolizado 2 de polvo de GPP (Protamex[®], 24h, a 50°C) (●), o 50 mg/kg de Captopril (■), en función del tiempo pasado tras la administración. Los datos representan la media ± ESM para un mínimo de seis (6) animales.

30
35

5 **La Figura 6A** es una gráfica que muestra la disminución de la presión arterial sistólica (PAS) obtenida en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) a las que se administra 1,5 mL de agua (◆), 5 mL/kg del hidrolizado 3 de polvo de GPP (Neutrase[®], 2h, a 50°C) (●), o 50 mg/kg de Captopril (■), en función del tiempo pasado tras la administración. Los datos representan la media ± ESM para un mínimo de seis (6) animales.

10 **La Figura 6B** es una gráfica que muestra la disminución de la presión arterial diastólica (PAD) obtenida en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) a las que se administra 1,5 mL de agua (◆), 5 mL/kg del hidrolizado 3 de polvo de GPP (Neutrase[®], 2h, a 50°C) (○), o 50 mg/kg de Captopril (■), en función del tiempo pasado tras la administración. Los datos representan la media ± ESM para un mínimo de seis (6) animales.

15 **La Figura 7** es una gráfica que muestra la disminución de la presión arterial sistólica (PAS) obtenida en ratas SHR espontáneamente hipertensas a las que se administra 1 mL de agua (●), 10 mg/kg del péptido de SEQ.ID.NO:2 (■), o 10 mg/kg del péptido de SEQ.ID.NO:4 (▲), en función del tiempo pasado tras la administración. Los datos representan la media ± ESM para un mínimo de cinco (5) animales.

20

EJEMPLOS

Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

25 **Ejemplo 1: Procedimiento de obtención de polvo de GPP.**

Se lavaron 15 kg de garras de patas de pollo (GPP) *gallus gallus domesticus* con agua y se trituraron en una trituradora industrial Cato utilizando una placa de corte de 8 mm. Este triturado se congeló en capas finas (1-1,5 cm) y se liofilizó durante 5 días. El liofilizado se molió con una batidora Fagor modelo BV-850 y el molido obtenido se
30 tamizó con un tamiz de tamaño de poro de 2 mm. Se obtuvo así un polvo fino con tamaño de partícula <2 mm y un contenido de humedad <5 % (polvo de GPP). El polvo de GPP que presentó un porcentaje de humedad superior al indicado se volvió a liofilizar o se dejó secar en una estufa a 50°C durante 15 h. Posteriormente, se guardó

a -20°C en botes cerrados y rodeados de sílica gel para evitar un aumento de la humedad de las muestra.

Ejemplo 2. Procedimiento de obtención de hidrolizados a partir del polvo de GPP, sin pretratamiento.

5 En un tubo de plástico de fondo redondo se pesó 0,1 g de polvo de GPP se le añadió 4,5 mL de agua destilada y se agitó en el vórtex durante 20 seg. El pH inicial de estas muestras estaba comprendido entre 6 y 9. Posteriormente, se le añadió la enzima en un volumen de 0,5 mL a una concentración de enzima/proteína de 0,4 AU (Unidades Anson), y de 80 LAPU en el caso de Flavourzyme®. Se probaron 4 tipos de enzimas 10 Alcalase® 2,4 L, Neutrase® 0,8 L, Protamex® y Flavourzyme® 1000 L (Novozyme) por separado. Estas enzimas tienen actividades diferentes (2,4; 0,8; 1,5 AU/g y 1000 LAPU/g, respectivamente) por lo que el volumen añadido de enzima varió dependiendo de la enzima y de la concentración de enzima/proteína ensayada. Se 15 preparó así una disolución en agua destilada con una concentración de enzima tal que al tomar 0,5 mL de esta disolución tuviera la concentración de enzima/proteína necesaria para realizar la hidrólisis. De esta manera se unificó el volumen final a añadir de todas ellas (0,5 mL). La enzima Protamex®, de venta en estado sólido, se reconstituyó en agua destilada a la concentración deseada antes de añadirse al 20 polvo de GPP. Una vez añadida la enzima, el pH de las mezclas se ajustó a 7. Las hidrólisis se realizaron a 25 ó 50°C en agitación constante a 250 rpm en orbital, durante 2, 4 ó 24 h. Como control se tomaron muestras en las que el tiempo de hidrólisis fue de 0 h. Finalizada la hidrólisis, las enzimas se inactivaron por calor en un baño de agua a 85°C durante 10 min. Las muestras se enfriaron en hielo durante 10 25 min y se centrifugaron a 10000 x g, 20 min, 4°C. Los sobrenadantes obtenidos son los hidrolizados, que se filtraron con filtros de 0,45 µm y congelaron a -20°C.

Ejemplo 3. Procedimiento de obtención de hidrolizados a partir del polvo de GPP, con pretratamiento.

30 En otras muestras, una vez obtenido el polvo de GPP se procedió a un pretratamiento de la proteína con cambios de pH y de temperatura. En tubos de plásticos de fondo redondo se pesaron 0,1 g de polvo de GPP, se les adicionó un volumen de agua destilada y se les ajustó el pH a 3, 7,5 o 10 con NaOH (0,1 M) o HCl (0,1 M) para un volumen final de 4 mL, con la condición de que el pH final de la muestra fuera al 35 menos un valor de 0,5 distinto del valor inicial determinado en el Ejemplo 2.

Posteriormente, los tubos se introdujeron en un baño de agua a una temperatura de 50 ó 100°C, y se dejaron en agitación 90 min. Transcurrido este tiempo, las muestras pretratadas a 100°C se dejaron enfriar hasta 50°C, se ajustó el pH del caldo obtenido a 7 con HCl 0,1M o NaOH 1 M, en todos los casos y se procedió entonces a realizar la hidrólisis enzimática. Tras este pretratamiento, a las muestras de GPP obtenidas se les añadieron 0,5 mL de una disolución de enzima Alcalase[®] 2,4 L, Neutrased[®] 0,8 L, Protamex[®] o Flavourzyme[®] 1000 L, a una concentración de enzima/proteína de 0,4 AU, y de 80 LAPU en el caso de Flavourzyme[®]. La preparación de la disolución de la enzima se realizó de igual forma que en el ejemplo anterior. El volumen final de reacción en todos los casos también fue de 5 mL por lo que se ajustaron los volúmenes con agua destilada. Una vez añadida la enzima, el pH de las mezclas se ajustó a 7. Las hidrólisis se realizaron a 25 ó 50°C en agitación constante a 250 rpm en orbital, durante 2, 4 ó 24 h. Como control se tomaron muestras en las que el tiempo de hidrólisis fue de 0 h. Finalizada la hidrólisis, las enzimas se inactivaron por calor en un baño de agua a 85°C durante 10 min. Las muestras se enfriaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 10000 x g, 20 min, 4°C. Los sobrenadantes obtenidos son los hidrolizados, que se filtraron con filtros de 0,45 µm y se congelaron a -20°C.

Ejemplo 4: Selección de los hidrolizados obtenidos a partir del polvo de GPP de acuerdo a su actividad IECA

Con el fin de seleccionar los hidrolizados de polvo de GPP (sobrenadantes filtrados) con actividad IECA se les realizó la determinación de la citada actividad como se describe en el Ejemplo 5, desechando aquellos hidrolizados con actividad inferior al 80% cuando se ensayaba el hidrolizado diluido a la mitad. Sólo se seleccionaron los hidrolizados cuyo sobrenadante diluido a la mitad mostraba un porcentaje de inhibición mayor del 80%, que resultaron ser cuarenta (40) hidrolizados. Como muestra de la variabilidad de porcentajes de actividades IECA mostrada por los hidrolizados obtenidos, en la **Tabla I** se recogen la actividad IECA de veintiocho (28) de ellos. En concreto, se muestran los resultados correspondientes a una hidrólisis con una dosis fijada de enzima de 0,4 AU para Alcalase[®], Neutrased[®], y Protamex[®] y 80 LAPU para Flavourzyme[®] y un tiempo y temperatura de hidrólisis también fijos de 24 horas y en el que varía únicamente el pretratamiento, comparándose muestras sin pretratamiento respecto de muestras a las que se han aplicado diferentes pretratamientos durante 90 min (diferentes pH: 3, 7,5 y 10 y diferentes temperaturas: 50 y 100°C). Los hidrolizados obtenidos a temperatura de hidrólisis de 25°C no resultaron interesantes

independientemente de las condiciones de pretratamiento, tal como muestran los valores de IC₅₀ obtenidos en cada caso (Tabla I).

Tabla I. Actividad IECA (%) de hidrolizados de polvo de GPP obtenidos con Alcalase[®], Neutrase[®], Protamex[®] (0,4 AU) y Flavourzyme[®] (80 LAPU) a 25°C durante 24 h sin y con tratamiento previo a la hidrólisis durante 90 min a 50°C (A) o 100°C (B).

A

Enzima	Sin pretratamiento	Tratamiento previo hidrólisis (90 min, 50°C)					
		IECA (%)			IC ₅₀ (µL)		
		pH 3	pH 7,5	pH 10	pH 3	pH 7,5	pH 10
Alcalase [®]	19,51	70,61	29,57	63,86	N.D	N.D	N.D
Neutrase [®]	37,10	88,82	85,43	79,53	1,62	1,82	2,40
Protamex [®]	65,76	89,74	57,33	74,34	2,79	N.D	2,38
Flavourzyme [®]	20,20	70,24	32,73	26,49	N.D	N.D	N.D

10 n= 6 por cada muestra

N.D: No determinado

B

Enzima	Tratamiento previo hidrólisis (90 min, 100°C)					
	IECA (%)			IC ₅₀ (µL)		
	pH 3	pH 7,5	pH 10	pH 3	pH 7,5	pH 10
Alcalase [®]	83,52	83,66	86,92	1,88	1,45	1,86
Neutrase [®]	87,93	91,49	91,46	1,49	1,40	1,69
Protamex [®]	92,31	90,05	96,37	1,13	1,10	1,01
Flavourzyme [®]	71,24	68,10	67,44	N.D	N.D	N.D

n= 6 por cada muestra

15 N.D: No determinado

En la **Tabla II** se muestran algunos de los hidrolizados con mejores actividades IECA obtenidos y la cantidad necesaria de sobrenadante necesario para producir una disminución enzimática del 50% (IC₅₀) expresada en µL/mL.

20

Tabla II. Actividad IECA (porcentaje de inhibición e IC₅₀) de los hidrolizados de polvo de GPP con mayores inhibiciones, obtenidos con Neutrase[®] y Protamex[®] (0,4 AU) a 50°C durante 0, 2, 4 y 24 h de hidrólisis.

Enzima	Tiempo Hidrólisis (h)	Tratamiento previo hidrólisis (90 min, 100°C)					
		IECA (%)			IC ₅₀ (µL)		
		pH3	pH 7,5	pH 10	pH3	pH 7,5	pH 10
Neutrase [®]	0	82,96	70,99	80,84	2,72	3,42	2,01
	2	93,77	93,77	94,04	0,90	0,89	1,01
	4	101,57	91,40	91,79	0,99	1,26	1,44
	24	91,03	93,02	93,13	0,98	0,83	1,10
Protamex [®]	0	81,63	82,58	85,21	4,07	2,60	3,14
	2	94,81	93,89	94,79	0,75	0,63	0,65
	4	94,65	95,81	96,45	0,69	0,58	0,59
	24	93,12	95,77	97,43	0,50	0,51	0,54

5

Se seleccionaron 3 hidrolizados como representantes de todos aquellos hidrolizados que mostraron un IC₅₀ <1 µL.

- El hidrolizado obtenido con Protamex[®] durante 2 h a 50°C pH 7 con pretratamiento previo a la hidrólisis de 100°C durante 90 min a pH 7,5 (IC₅₀=0,63 µL de hidrolizado o 29 µg de proteína/mL de hidrolizado), al que denominamos hidrolizado 1.
- El hidrolizado obtenido con Protamex[®] durante 24 h a 50°C pH 7 con pretratamiento previo a la hidrólisis de 100°C durante 90 min a pH 7,5 (IC₅₀=0,51 µL de hidrolizado o 9.56 µg de proteína/mL de hidrolizado), al que denominamos hidrolizado 2.
- El hidrolizado obtenido con Neutrase[®] durante 2 h a 50°C pH 7 con pretratamiento previo a la hidrólisis de 100°C durante 90 min a pH 7,5 (IC₅₀=0,89 µL de hidrolizado o 46,27 µg de proteína/mL de hidrolizado), al que denominamos hidrolizado 3.

Ejemplo 5: Medida de la actividad IECA de los hidrolizados y péptidos

La medida de la actividad IECA se realizó según el método descrito por Sentrandreu y Toldrá (Sentrandreu, MN, y Toldrá F. "A rapid simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme". 2006. Food Chem. 97, 546-

25

554) y modificado posteriormente por Quirós y col. (Quirós, A. y col. "Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of beta-casein-peptides with antihypertensive properties" 2009. Peptides, 30, 1848-1853). Es un método fluorimétrico en el que se utiliza como sustrato de la ECA la o-aminobenzoilglicil-p-nitrophenilalanilprolina (o-Abz-Gly-p-Phe(NO₂)-Pro-OH). La fluorescencia generada por la liberación del grupo aminobenzoilglicina se midió utilizando una longitud de onda de excitación de 350 nm y una de emisión de 420 nm. El porcentaje de inhibición (% Inhibición) se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 1 - \frac{(\text{Blanco}) - (\text{Blanco de muestra})}{(\text{Control}) - (\text{Blanco de sustrato})} \times 100$$

La concentración de proteína de los hidrolizados para determinar el valor de IC₅₀ se determinó por el método Kjeldahl (FIL-IDF. "Milk. Determination of nitrogen content (Kjeldahl method). Standard 20B". 1993. Int. Dairy Fed. Bruselas, Bélgica) multiplicando el porcentaje de nitrógeno de la muestra por 6,25.

Ejemplo 6: Aislamiento, identificación y síntesis de péptidos con actividad IECA

Se utilizaron equipos de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) analítica y semipreparativa, así como un equipo de espectrometría de masas (MS) en tándem que permitió la secuenciación de los péptidos. Se realizaron las etapas que se mencionan a continuación.

6.A. Obtención de la fracción soluble del hidrolizado 1 de polvo de GPP

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 se obtuvieron 250 mL del hidrolizado proteico denominado hidrolizado 1, cuyo sobrenadante se centrifugó nuevamente en dispositivos de filtrado (Centripep, Amicon Inc) con membrana hidrofílica de 3000 Da de tamaño de poro. El permeado (fracción menor de 3000 Da) obtenido se recogió, liofilizó y guardó -20°C hasta su posterior fraccionamiento.

6.B Fraccionamiento por HPLC en fase reversa a escala semipreparativa

El HPLC semipreparativo empleado fue de la serie 1260 de Agilent (Agilent Technologies) que consta de una bomba cuaternaria, un controlador de gradiente, un inyector, un detector de dispositivo de diodos (*diode array*), un colector de fracciones y

un software de adquisición y procesado de datos (Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition for LC & LC/MS systems A.01.04).

Se disolvió en agua el permeado liofilizado obtenido en apartado 6A a una
 5 concentración de 10 mg/mL y se procedió a la separación de los péptidos por
 cromatografía en fase reversa utilizando una columna C₁₈ (Europa peptide, 120 A^o, 25
 x 1.0 mm, 5 µm; Teknokroma). Los disolventes utilizados fueron una mezcla de agua:
 ácido trifluoroacético (1000:1) y acetonitrilo: ácido trifluoroacético (1000:0,8),
 disolventes A y B respectivamente, y la elución se realizó a un flujo de 4 mL/min
 10 utilizando los siguientes gradientes en el orden de aparición: 0 a 40 % del disolvente
 B en 50 min), 40-45 % de B en 1 min, 45-90 % de B en 4 min, 90-0 % de B en 1 min.
 El volumen de muestra inyectado fue de 750 µL y la absorbancia del disolvente se
 monitorizó a 214 nm.

15 Se recogieron 8 fracciones diferentes (**Figura 1**) denominadas F.1 - F.8 a partir del
 hidrolizado proteico denominado hidrolizado 1, las cuales se liofilizaron y se
 reconstituyeron en agua a diferentes volúmenes. El contenido proteico de estas
 fracciones reconstituidas se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCATM
 Protein Assay Kit, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. A
 20 dichas fracciones se les determinó la actividad IECA según el protocolo descrito en el
 Ejemplo 5 (Tabla IV). A aquellas fracciones con un porcentaje de actividad IECA
 superior al 80 % se les determinó el IC₅₀, observándose que las fracciones con menor
 valores fueron la F.3 y la F.6, con 1,99 y 1,24 µg/mL de proteína, respectivamente.

25 **Tabla IV.** Contenido proteico, porcentaje de actividad IECA e
 IC₅₀ de las fracciones obtenidas por HPLC en fase inversa a
 partir del permeado de tamaño < 3000 Da obtenido del
 hidrolizado proteico denominado hidrolizado 1.

Fracción	Concentración de proteína (µg/mL)	Actividad IECA (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
F.1	59,38	66,88 ± 1,91	
F.2	126,18	93,07 ± 1,18	12,08
F.3	30,56	80,45 ± 1,36	1,99
F.4	31,43	69,64 ± 1,34	
F.5	37,61	80,33 ± 2,81	3,59

F.6	45,22	89,55 ± 0,80	1,24
F.7	13,59	36,27 ± 4,05	
F.8	32,25	0	

n=3 por fracción

Las fracciones F.3 y F.6 con mayor actividad IECA se sometieron a un segundo fraccionamiento por HPLC en fase inversa a escala semipreparativa utilizando el mismo equipo, columna y disolventes pero eluyendo la muestra con un gradiente lineal del 10-20% del disolvente B en A en 40 minutos y del 20 al 30% del disolvente B en A en 40 minutos para F.3 y F.6, respectivamente. Se recogieron 6 subfracciones a partir de la fracción F.3 (F.3.1, F.3.2, F.3.3, F.3.4, F.3.5, F.3.6) y 8 de la subfracción F.6 (F.6.1, F.6.2, F.6.3, F.6.4, F.6.5, F.6.6, F.6.7, F.6.8) (**Figura 2A y 2B**). A todas estas subfracciones se les determinó la actividad IECA siguiendo el método ya descrito en el Ejemplo 5 y la concentración de proteína por el método BCA (BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante (Tablas V y VI). A aquellas fracciones con un porcentaje de actividad IECA superior al 75% se les determinó también el IC₅₀. A partir de estos resultados, se seleccionaron las subfracciones con un menor IC₅₀, en concreto la F.3.3 y la F.6.6 con valores de IC₅₀ de 0,83 y 0,86 µg/mL respectivamente. Ambas subfracciones elúan aproximadamente entre los minutos 12 y 16, utilizando el método de separación descrito anteriormente (12,5-15,5 min y 13-14 min para F.3.3 y F.6.6, respectivamente). Las dos subfracciones, que contenían péptidos con actividad IECA, se recogieron, liofilizaron y se mantuvieron a -20°C hasta la posterior identificación de los péptidos responsables de dicha actividad.

Tabla V. Contenido proteico, actividad IECA e IC₅₀ de las subfracciones obtenidas por HPLC en fase inversa a partir de la fracción F.3.

Subfracción	Concentración de proteína (µg/mL)	Actividad IECA (%)	IC₅₀ (µg/mL)
F.3.1	36,06	67,68 ± 4,41	11,23
F.3.2	42,25	82,37 ± 1,22	5,64
F.3.3	20,96	91,75 ± 4,72	0,83
F.3.4	19,93	81,45 ± 3,83	1,97
F.3.5	65,07	81,56 ± 0,44	11,77
F.3.6	38,03	72,99 ± 0,37	12,01

n= 3 por fracción

Tabla VI. Contenido proteico, actividad IECA e IC₅₀ de las subfracciones obtenidas por HPLC en fase inversa a partir de la fracción F.6.

Subfracción	Concentración de proteína (µg/mL)	Actividad IECA (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
F.6.1	26,67	44,74 ± 2,15	
F.6.2	26,67	12,75 ± 0,05	
F.6.3	26,67	80,71 ± 4,29	6,24
F.6.4	26,67	84,03 ± 1,99	4,73
F.6.5	26,67	88,28 ± 2,81	3,90
F.6.6	26,67	91,66 ± 0,86	0,86
F.6.7	26,67	75,17 ± 6,18	4,62
F.6.8	26,67	76,93 ± 1,55	5,01

5

n= 3 por fracción

6.C. Identificación de péptidos con actividad IECA por espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

10 Para la identificación de los péptidos responsables de la actividad IECA de las subfracciones F.3.3 y F.6.6 obtenidas por HPLC semipreparativo a partir del hidrolizado 1 y posteriormente de las fracciones 3 y 6, respectivamente, se utilizó un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos (ThermoFisher Scientific) dotado de una fuente de ionización nano (Proxeon) conectada on-line a un nano-HPLC Easy-LC

15 (Proxeon, ThermoFisher Scientific). Para lo cual, se reconstituyeron en agua y se diluyeron las fracciones con TFA 0,1% hasta una concentración de proteína de 0,1 µg/µl. La separación de los péptidos de las fracciones se realizó utilizando una precolumna C18 EASY-Column, 2 cm, ID 100µm, 5 µm y una columna C18 EASY-Column, 10 cm, ID 75 µm, 3 µm, (Thermo Scientific) en la que se inyectaron 10 µL de

20 las fracciones diluidas. Las fases móviles utilizadas fueron 0,1 % ácido fórmico: 2% acetonitrilo (fase A) y 0,1 % de ácido fórmico en 100 % de acetonitrilo (solvente B) y la velocidad del flujo fue de 400 nL/min. Para la fracción F.3.3. Los gradientes utilizados fueron: 0-45 % B en 80 min, de 45-100 % B en 20 min y 100 % B durante 10 min. Para la fracción F.6.6 se utilizó un gradiente de 0-35 % B en 40 min, 35-100 % B en 10 min

25 y 100 % B durante 10 min.

Todos los espectros de masas se adquirieron en modo ion positivo. El escáner (m/z 50-2000) se adquirió con un valor dirigido de 1000000 en una resolución de 30000 a 400 m/z y los 20 iones más intensos se seleccionaron para fragmentación de disociación inducida por colisión en el LTQ con un valor dirigido de 10000 y una energía de colisión de 35 %. Para la identificación de las secuencias peptídicas se utilizó el programa Proteome Discoverer 1.4.288 (Thermo) con MASCOT 2.4.1.0 y se realizó la búsqueda de las secuencias en una base de datos de proteínas de pollo en las que se incluían 25992 secuencias (IPI_chicken_3.81). Se identificaron los péptidos que se recogen en la Tabla VII.

10

Tabla VII. Péptidos identificados en las subfracciones F.3.3 y F.6.6

Subfracción	SEQ. ID. NO:	Masa Teórica	Masa experimental
F.3.3	1	1146,38	1162,60
F.3.3	2	1162,38	1162,60
F.3.3	3	1211,39	1211,62
F.3.3	4	1075,17	1075,47
F.6.6	5	647	647,36
F.6.6	6	746,91	747,44
F.6.6	7	622	640,44
F.6.6	8	1106,58	1107,59
F.6.6	9	1068	1068,53

15 6.D Síntesis de los péptidos con actividad IECA

Los péptidos de la invención se enviaron a sintetizar químicamente a Caslo ApS (Lyngby, Dinamarca) y se obtuvieron preparados con los siguientes valores de pureza:

SEQ.ID.NO:1 = 99,68%, SEQ.ID.NO:2 = 90,19%, SEQ.ID.NO:3 = 98,09%,
 SEQ.ID.NO:4 = 99,10%, SEQ.ID.NO:5 = 99,33%, SEQ.ID.NO:6 = 99,71%,
 20 SEQ.ID.NO:7 = 99,71%, SEQ.ID.NO:8 = 99,64% y SEQ.ID.NO:9 = 98,39%.

Una vez sintetizados se les determinó la actividad IECA con el fin de conocer cuál o cuáles de los péptidos identificados en las subfracciones F.3.3 y F.6.6 eran el o los responsables de dicha actividad en las fracciones. En la **Tabla VII** se muestra los

resultados obtenidos en la determinación de la citada actividad representada como IC₅₀ (µM).

5 **Tabla VIII.** Valores de IC₅₀ de los péptidos identificados de las subfracciones F.3.3 y F.6.6 con mejor actividad IECA obtenidas del hidrolizado antihipertensivo denominado hidrolizado 1

Subfracción	Péptido	IC ₅₀ (µM)
F.3.3	SEQ.ID.NO: 1	29,71
F.3.3	SEQ.ID.NO: 2	11,01
F.3.3	SEQ.ID.NO: 3	>137,6
F.3.3	SEQ.ID.NO: 4	44,75
F.6.6	SEQ.ID.NO: 5	>515,4
F.6.6	SEQ.ID.NO: 6	80,91
F.6.6	SEQ.ID.NO: 7	7,06
F.6.6	SEQ.ID.NO: 8	>150
F.6.6	SEQ.ID.NO: 9	>150

n= 4 por péptido

10

La medida de la actividad IECA de los péptidos sintetizados mostró que de los 9 péptidos ensayados, 5 de ellos presentaron la citada actividad, observándose concentraciones de IC₅₀ inferiores a 100 µM. En concreto, los péptidos identificados como SEQ.ID.NO:2 y 7 fueron los que presentaron mayor actividad IECA (menor valor IC₅₀), que estaban presentes en las subfracciones F.3.3 y F.6.6, respectivamente. Ambos se seleccionaron para determinarles su actividad antihipertensiva en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y en ratas Wistar-Kyoto (WHY).

15

20 **Ejemplo 7: Medida de la actividad antihipertensiva en ratas del hidrolizado 1 de polvo de GPP.**

Se seleccionó el hidrolizado obtenido con Protamex[®] 2h a 50°C con pretratamiento de 100°C, pH 7.5 durante 90 min, ya que presentaba una buena actividad IECA, para estudiar el efecto de este hidrolizado sobre la PA en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y en ratas Wistar-Kyoto (WKY), que son el control normotenso de

las ratas SHR. El hidrolizado proteico de polvo de GPP denominado hidrolizado 1 se preparó según el procedimiento descrito en el Ejemplo 4.

5 Para realizar estos estudios, se utilizaron ratas macho SHR y WKY de 17-20 semanas de vida y peso comprendido entre 300 y 360 g, procedentes de Charles River Laboratories España S.A. Las ratas permanecieron con una temperatura ambiental estable de 23°C, y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, ingiriendo agua y comida a libre disposición. La medida de la PA en estos animales se llevó a cabo con una modificación de la técnica del manguito en la cola (*tail-cuff*), originalmente descrita por
10 Buñag (Buñag RD. "Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure". 1973. J. Appl. Physiol. 34, 279-282). En el presente ejemplo se evaluaron la modificación de la presión arterial sistólica (PAS) y de la presión arterial diastólica (PAD) producida por la administración aguda del hidrolizado proteico obtenido a partir de polvo de GPP. Antes de colocar el manguito en la cola de las ratas, éstas se
15 exponían a una temperatura próxima a los 37°C para facilitar la dilatación de la arteria caudal. Para asegurar la fiabilidad de la medida, los animales se acostumbraban al procedimiento 2 semanas antes de llevar a cabo el ensayo.

La administración del hidrolizado 1 a ensayar se realizó por sonda intragástrica en un
20 margen de tiempo comprendido entre las 9 h y las 10 h de la mañana. Las ratas SHR utilizadas para el estudio tenían en ese momento valores de PAS y de PAD comprendidos respectivamente entre 192 y 212 mm Hg, y entre 140 y 180 mm Hg. Las ratas WKY utilizadas para el estudio tenían en ese momento valores de PAS y de PAD comprendidos respectivamente entre 110 y 140 mm Hg, y entre 90 y 110 mm Hg. Se
25 tomaron medidas de la PAS y de la PAD en los animales periódicamente, cada 2 horas, hasta 48 horas post-administración de los productos a ensayar utilizando un medidor de PA para ratas modelo Le50001 (Letica). La cantidad de hidrolizado administrada fue de 5 mL/kg de peso corporal del animal. El procedimiento realizado en los animales fue aprobado por el Comité Ético de la Universitat Rovira i Virgili.

30 Como control negativo para establecer la variación circadiana de la PAS y de la PAD en ratas sondadas se utilizaron las medidas de la PAS y de la PAD obtenidas en ratas a las que se les administraba por sonda intragástrica 1,5 mL de agua. Como control positivo para establecer el efecto sobre la PAS y sobre la PAD de un fármaco IECA
35 prototipo, tal como Captopril, se utilizaron las medidas de la PAS y de la PAD

obtenidas en ratas a las que se les administraba por sonda intragástrica 50 mg /kg de Captopril. Esta dosis de Captopril se administraba a cada rata en un volumen de 1,5 mL.

- 5 Los resultados obtenidos se agruparon y se obtuvo la media \pm el error estándar de la media (ESM) para un mínimo de 6 ensayos homogéneos. Los datos de los tres grupos de animales se compararon en un análisis de la varianza de 2 vías (ANOVA) utilizando el test de Tukey en cada tiempo de post-administración con el programa estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics software versión 20.0) y se consideró
10 significativa la diferencia para valores de $p < 0,05$.

Las **Figuras 3A y 3B** muestran, respectivamente, la disminución de la PAS y de la PAD obtenida en ratas SHR a distintos tiempos, tras la administración de hidrolizado de polvo de GPP con Protamex[®], 2h, a 50°C (hidrolizado 1). Dichas figuras incluyen,
15 además, la disminución de la PAS y de la PAD observada tras la administración de Captopril. Como era previsible, el Captopril produjo una pronunciada disminución de la PAS y de la PAD en las ratas SHR. La disminución de la PAS y de la PAD fueron máximas a las 6 horas después de la administración del fármaco. Este hidrolizado de polvo de GPP produjo una disminución significativa de la PAS y de la PAD en los
20 animales a las 6 horas después de su administración que fue significativamente igual a la producida por el Captopril en ese mismo tiempo. A partir de las 2 horas del consumo del hidrolizado comienza a disminuir la PAS y la PAD de los animales tratados pero esta bajada de presión no fue significativamente diferente a la producida por ratas no tratadas hasta llegar a las 6 horas. Los valores de la PAS y de la PAD
25 observados 24 horas después de las distintas administraciones eran semejantes a los que tenían los animales antes de las mismas.

Las **Figuras 4A y 4B** muestran respectivamente los cambios de la PAS y de la PAD obtenidos en ratas WKY a distintos tiempos, tras la administración del hidrolizado 1 de
30 polvo de GPP. Puede apreciarse que el hidrolizado no modificó ni la PAS ni la PAD de los animales tratados. Estos resultados permiten descartar posibles efectos indeseables en el hidrolizado ensayado sobre la PA de sujetos normotensos.

Ejemplo 8: Medida de la actividad antihipertensiva en ratas del hidrolizado 2 de
35 **polvo de GPP**

La determinación de la actividad antihipertensiva *in vivo* en ratas SHR del hidrolizado obtenido de polvo de GPP denominado hidrolizado 2 (Hidrólisis con Protamex[®] 24h a 50°C con pretratamiento de 100°C, pH 7.5 durante 90 min) se realizó siguiendo el método y procedimiento descrito en el ejemplo 7. La concentración ensayada del hidrolizado fue 5 mL/kg y también se ensayaron agua (1,5 mL) y captopril (5 mg/kg) como controles negativo y positivo, respectivamente.

Las **Figuras 5A y 5B** muestran la variación de la PAS y de la PAD, respectivamente, de ratas SHR tras la administración vía intragástrica del hidrolizado 2, de agua y de captopril a las dosis anteriormente citadas. Estas curvas de PA muestran como a medida que transcurre el tiempo desde que el animal ingirió el hidrolizado 2 fue disminuyendo tanto la PAS como la PAD hasta alcanzar la máxima bajada a las 8h de post-administración (26 y 34 mm HG, respectivamente). Posteriormente, el efecto antihipertensivo comienza a revertir. Los efectos observados sobre la PA tras la administración de agua o captopril son los esperados como se describen en el ejemplo 7.

Ejemplo 9: Medida de la actividad antihipertensiva en ratas del hidrolizado 3 de polvo de GPP.

La determinación de la actividad antihipertensiva *in vivo* en ratas SHR del hidrolizado obtenido de polvo de GPP denominado hidrolizado 3 (Hidrólisis con Neutrase[®] 24h a 50°C con pretratamiento de 100°C, pH 7.5 durante 90 min) se realizó siguiendo el método y procedimiento descrito en el ejemplo 7. La concentración ensayada del hidrolizado 3 fue 5 mL/kg y también se ensayaron agua (1,5 mL) y captopril (5 mg/kg) como controles negativo y positivo, respectivamente.

Las **Figuras 6A y 6B** muestran, respectivamente, la disminución de la PAS y de la PAD obtenida en ratas SHR a distintos tiempos, tras la administración de hidrolizado de **polvo de GPP** con Neutrase[®], 2h, a 50°C (hidrolizado 3). La ingesta del hidrolizado 3 mostró un efecto antihipertensivo a partir de las 2h de su administración oral, siendo máxima a las 6 h. Se observaron valores de bajada de PAS y PAD similares a los producidos por el fármaco captopril a esa hora. Las curvas de la PAS y PAD de las ratas SHR tratadas con agua y con captopril mostraron el efecto esperado como se describe en el ejemplo 7.

35

Ejemplo 10: Medida de la actividad antihipertensiva en ratas de los péptidos con actividad IECA identificados en el hidrolizado 1 antihipertensivo

Una vez identificados los péptidos presentes en el hidrolizado antihipertensivo (**Tabla VII**) y de determinar cuáles de ellos presentaban actividad IECA (**Tabla VIII**) se procedió a determinar la actividad antihipertensiva *in vivo* de los péptidos más activos. Durante la digestión, los péptidos ingeridos se pueden hidrolizar por las proteasas del tracto digestivo y perder su actividad o bien no ser capaces de atravesar la barrera intestinal y por lo tanto no ser absorbidos. Es por ello que es necesario, realizar estudios *in vivo* para evaluar la actividad antihipertensiva de los mismos una vez son digeridos. El grado de hidrólisis producido por la digestión fisiológica de un determinado péptido va a depender de su tamaño, de su naturaleza, y de la presencia de otros péptidos en el medio (FitzGerald y col., "Hypotensive peptides from milk proteins". 2004. J. Nutr. 134(4), 980S – 988S).

La actividad antihipertensiva de los péptidos que presentaron la mayor actividad IECA (SEQ.ID.NO:1, 2, 4, 6 y 7) se realizó en ratas macho SHR de 17-20 semanas de vida siguiendo el mismo método descrito en el Ejemplo 5. Las condiciones de mantenimiento y alimentación de los animales fueron también las mismas a las descritas en el Ejemplo 7. De igual manera, se utilizaron como control negativo y positivo, agua y captopril (50 mg/kg), respectivamente y en el caso de los péptidos, se testaron individualmente, administrándole a cada animal un volumen de 1,5 mL del péptido disuelto en agua a una concentración de 10 mg/kg, ya que dicho volumen era equiparable al volumen de hidrolizado 1 que recibía cada animal. Estos péptidos se sintetizaron químicamente como se describe en el apartado 4D.

Los resultados obtenidos se agruparon y se obtuvo la media \pm el ESM para un mínimo de 5 ensayos homogéneos. Los resultados más prometedores fueron los obtenidos con los péptidos denominados como SEQ.ID.NO: 2 y 4. Los datos de los tres grupos de animales (tratados con agua, con el péptido SEQ.ID.NO:2 y con el péptido SEQ.ID.NO:4) se compararon en un análisis de la varianza de 2 vías (ANOVA) y de 1 vía, en este último caso, para comprobar el efecto de los péptidos sobre la PA a las horas de estudio (0, 2, 4, 8 y 24 h) de forma individual. En ambos casos se utilizó el test de Tukey y los análisis se realizaron con el programa estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics software versión 20.0). Se consideró significativa la diferencia para valores de $p < 0,05$.

Según los resultados que se muestran en la **Figura 7** la ingesta de los péptidos SEQ.ID.NO:2 y 4 produjo una disminución de la PAS, a las 4 ó 6 h después de su administración, respectivamente. En ambos casos, la máxima bajada se produjo a las
5 6 h después de su administración, observándose un efecto antihipertensivo significativamente superior ($P < 0,01$) con el péptido de SEQ.ID.NO:4. La PAS recuperó sus valores iniciales a las 8 o 24 horas posteriores a su ingesta.

Las administraciones individuales de los péptidos SEQ.ID.NO:1, 6 y 7 a las ratas SHR
10 no produjeron una significativa disminución de la PAS (datos no mostrados).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de un hidrolizado enzimático con actividad antihipertensiva, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) triturar garras de pata de pollo y liofilizar para obtener un material en polvo con tamaño de partícula <2 mm;
- b) ajustar una disolución acuosa del polvo anterior a un pH entre 3 y 10, y calentar entre 80 y 120°C durante entre 60 y 90 min, con la condición de que dicho valor de pH sea distinto del correspondiente al material en polvo de la etapa anterior en al menos 0,5;
- 10 c) enfriar la disolución anterior a una temperatura entre 45 y 55°C y realizar una hidrólisis enzimática durante un tiempo de entre 1 y 24 h con enzimas proteolíticas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* identificadas como E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28;
- d) evaluación de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina según el método descrito en Sentandreu, MN y Toldrá F. 2006. Food Chem. 97, 546-554; y
- 15 e) selección de un hidrolizado con actividad > 80% en disolución acuosa al 50% v/v a partir de la evaluación anterior.
- 20 2. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado por que el tiempo de hidrólisis de la etapa c) es de entre 2 y 24 h.
3. Un procedimiento de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
- 25 a) triturar garras de pata de pollo y liofilizar para obtener un material en polvo con tamaño de partícula <2 mm;
- b) ajustar una disolución acuosa del polvo a un pH de 7,5 y calentar a 100°C durante 90 min, en que dicho pH de 7,5 es distinto del correspondiente al material en polvo de la etapa anterior en al menos un valor de 0,5;
- 30 c) enfriar la disolución anterior a una temperatura de 50°C e hidrolizar durante un tiempo de 2 ó 24 h con enzimas proteolíticas obtenidas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* identificadas como E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28;
- d) evaluación de la actividad inhibidora de enzima convertidora de angiotensina según el método descrito en Sentandreu, MN y Toldrá F. 2006. Food Chem. 97,546-554; y
- 35

- e) selección de un hidrolizado con actividad > 80% en dilución acuosa al 50% v/v a partir de la evaluación anterior.
4. Hidrolizado enzimático caracterizado por que comprende los péptidos identificados por SEQ.ID.NO:1-9 o sales de los mismos.
 - 5 5. Uso del hidrolizado enzimático de la reivindicación 4, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la hipertensión en un sujeto.
 6. Uso de acuerdo a la reivindicación 5, caracterizado por que dicho sujeto es humano.
 7. Composición farmacéutica que comprende un hidrolizado enzimático que contiene
10 los péptidos identificados por SEQ.ID.NO:1-9 o sales de los mismos, y excipientes farmacéuticamente aceptables,
en que dicha composición está en forma líquida o jarabe.
 8. Péptido identificado por una de las secuencias SEQ.ID.NO:2 ó 4.
 9. Uso de un péptido identificado por las SEQ.ID.NO:2 ó 4 o sales de los mismos, o
15 la combinación de ellos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de hipertensión.
 10. Composición farmacéutica que comprende un péptido identificado por la secuencia SEQ.ID.NO:2 ó 4 o sales de los mismos o la combinación de ellos, y excipientes farmacéuticamente aceptables.
 - 20 11. Suplemento alimenticio que comprende un péptido identificado por la secuencia SEQ.ID.NO:2 ó 4 o sales de los mismos o la combinación de ellos, y aditivos alimentarios.

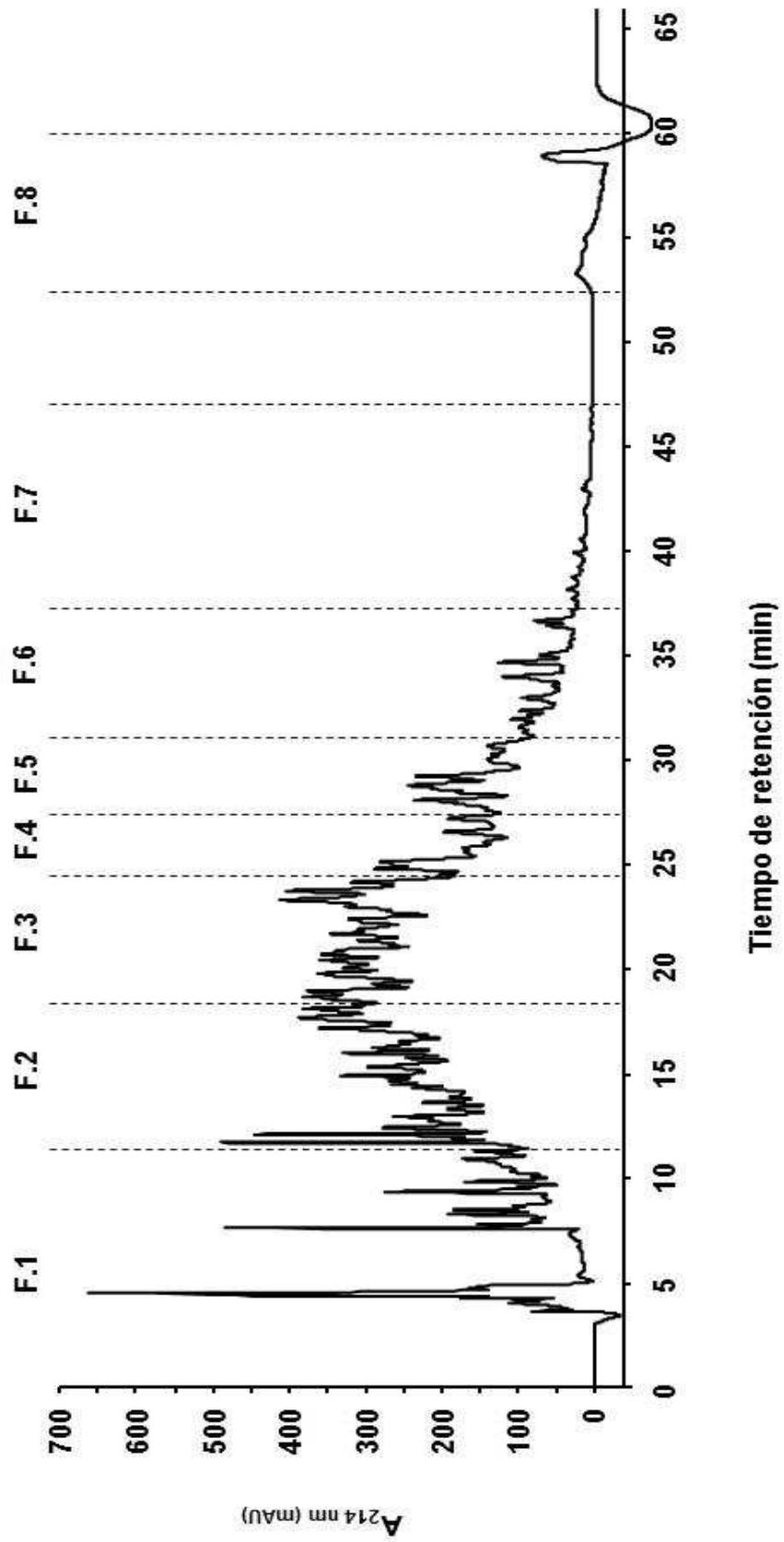


Figura 1

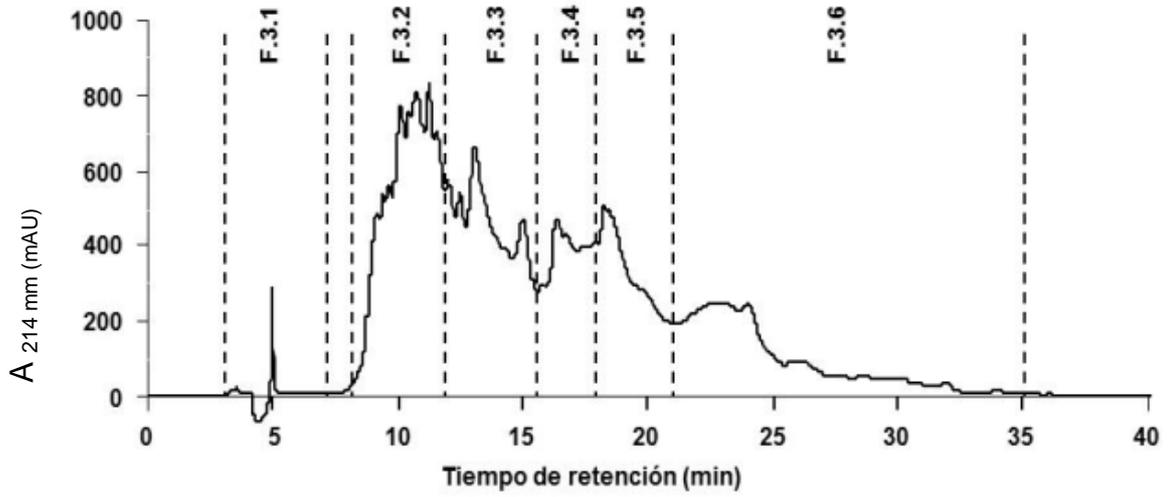


Figura 2A

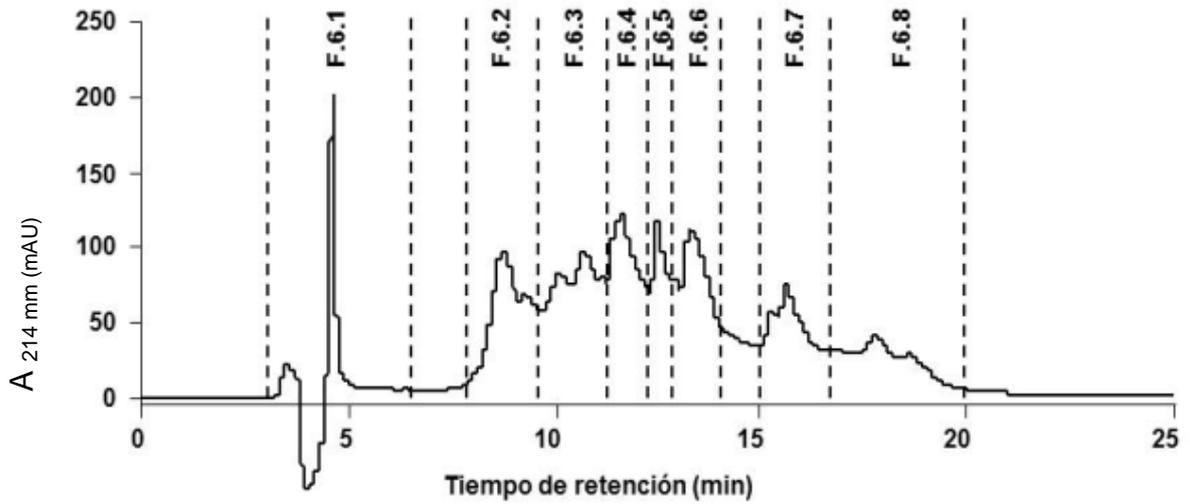


Figura 2B

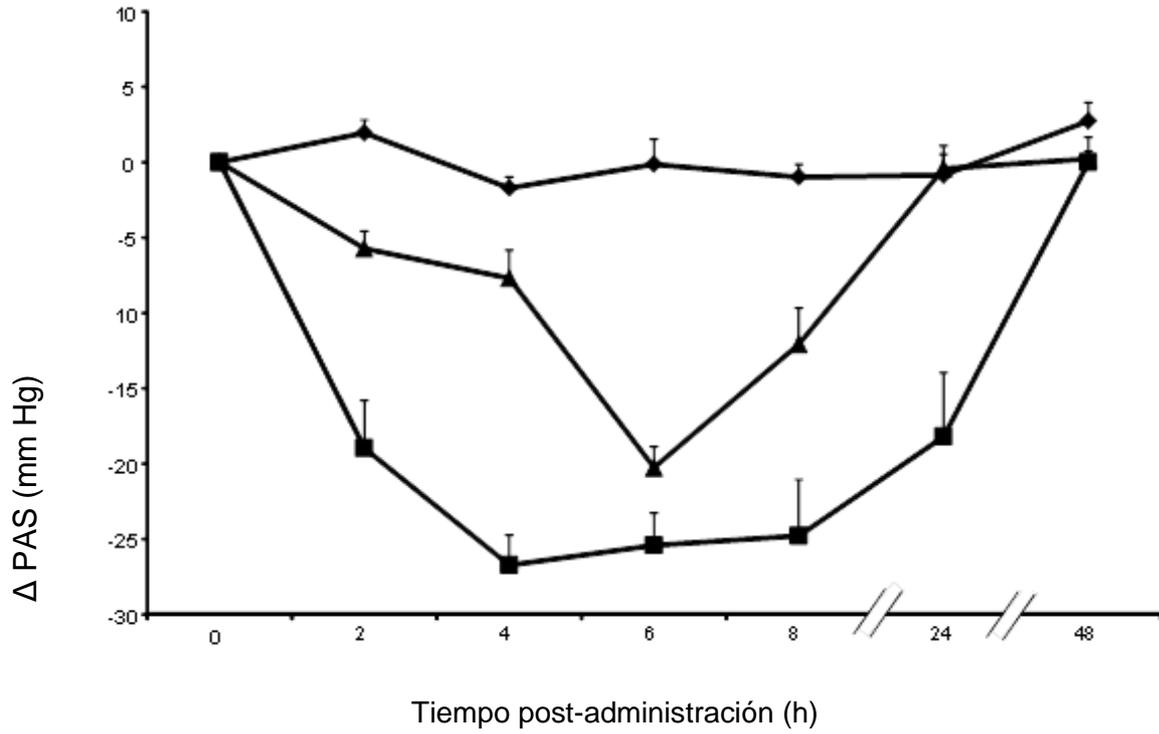


Figura 3A

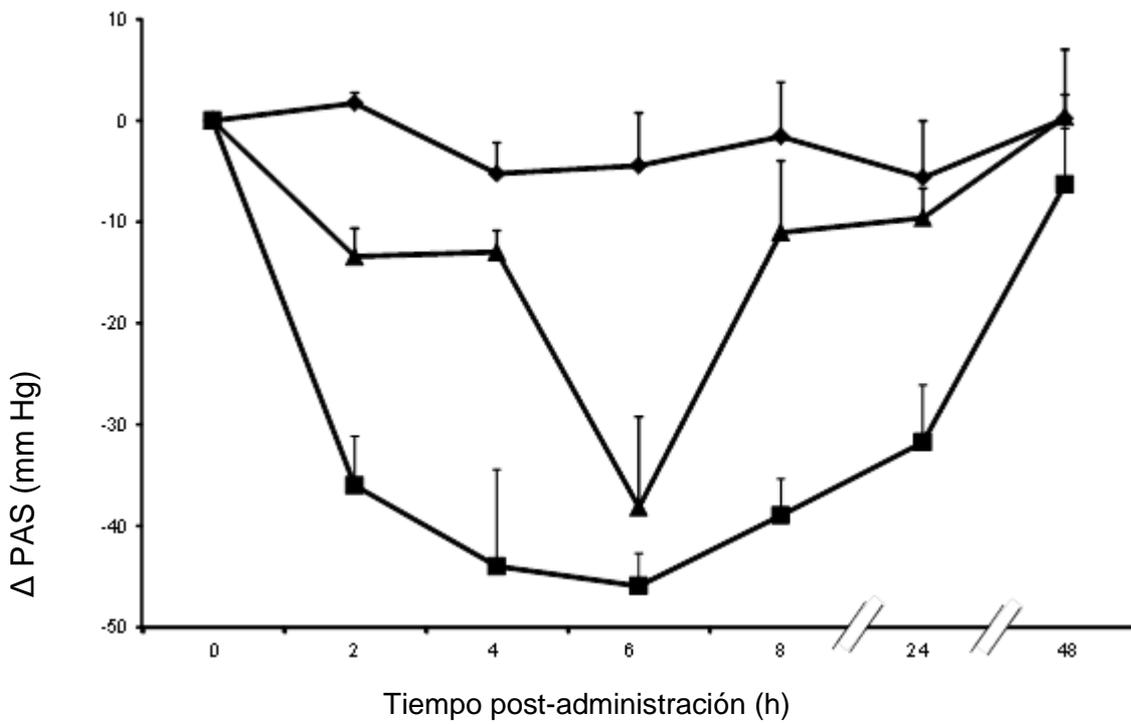


Figura 3B

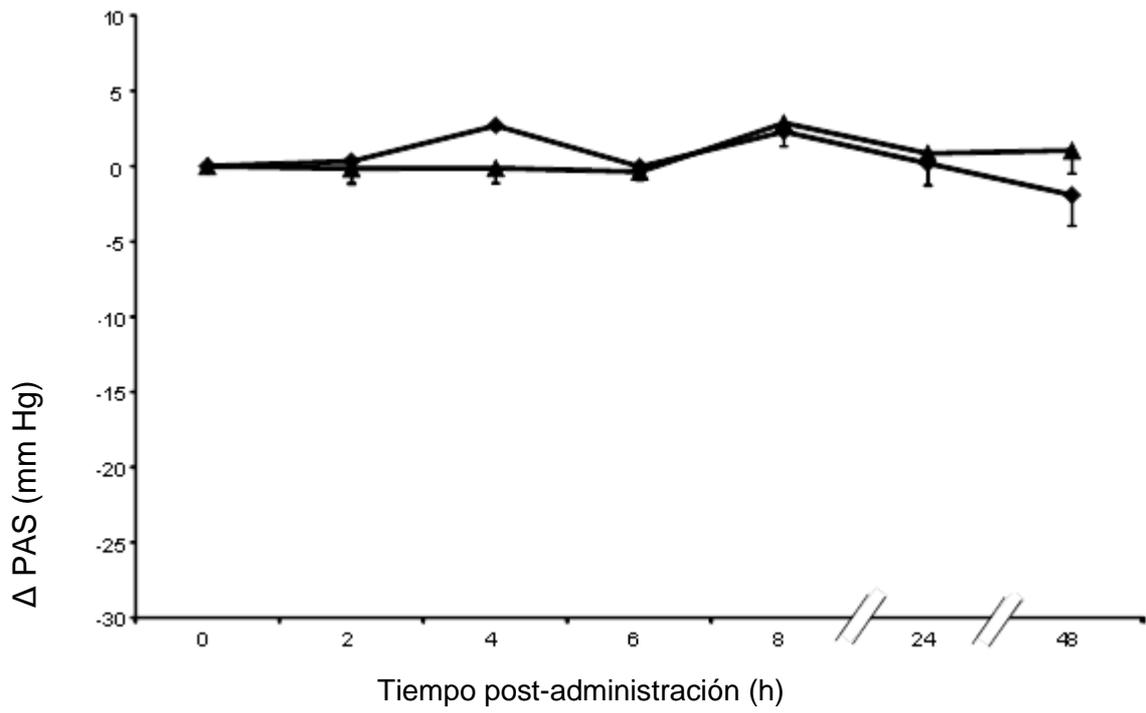


Figura 4A

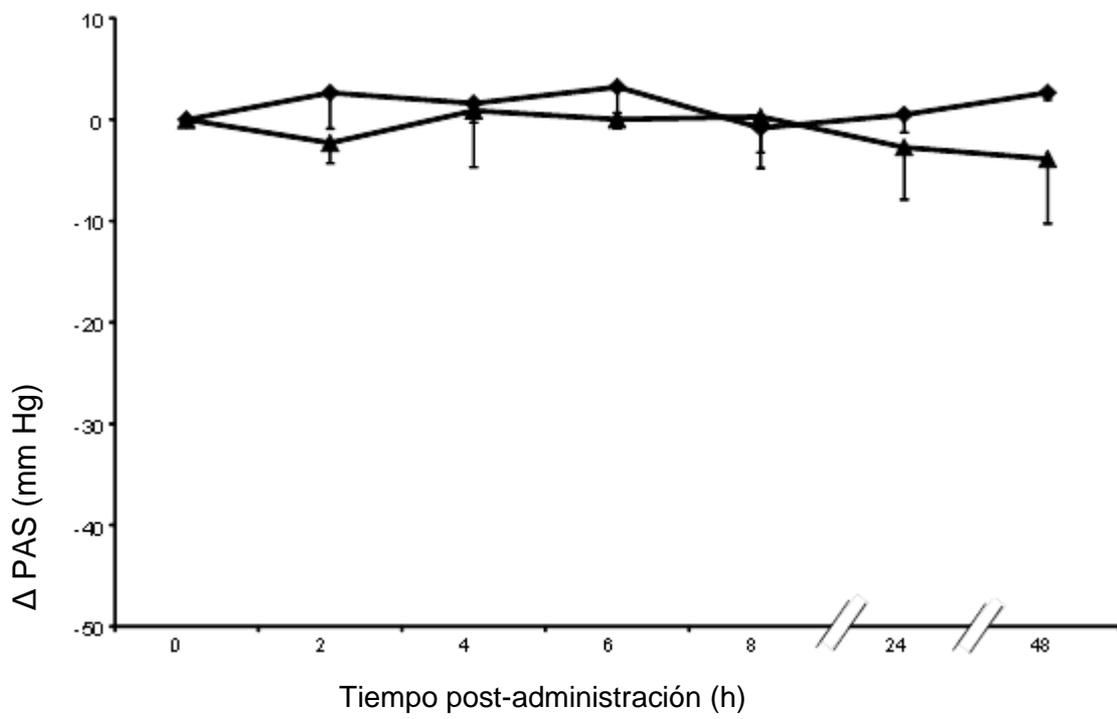


Figura 4B

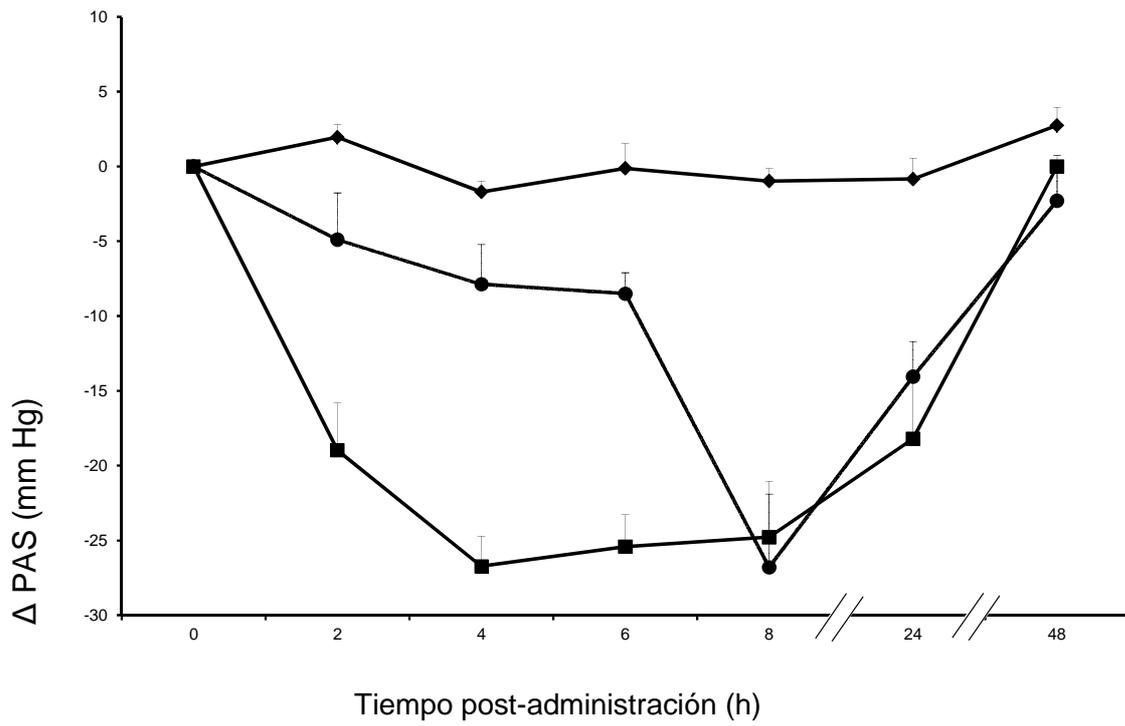


Figura 5A

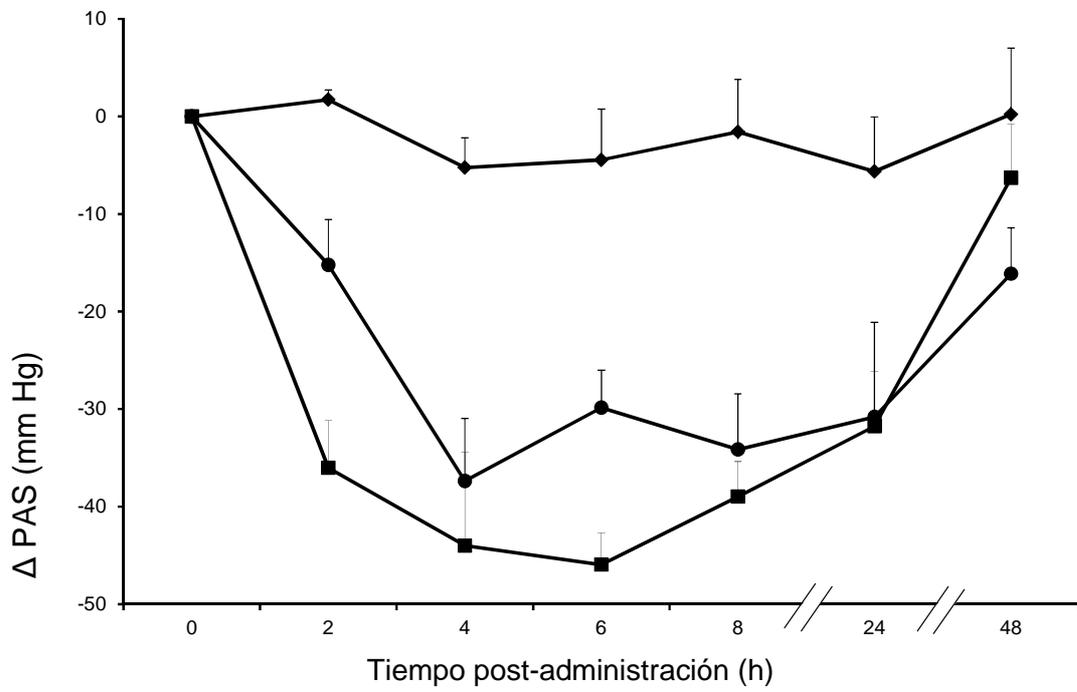


Figura 5B

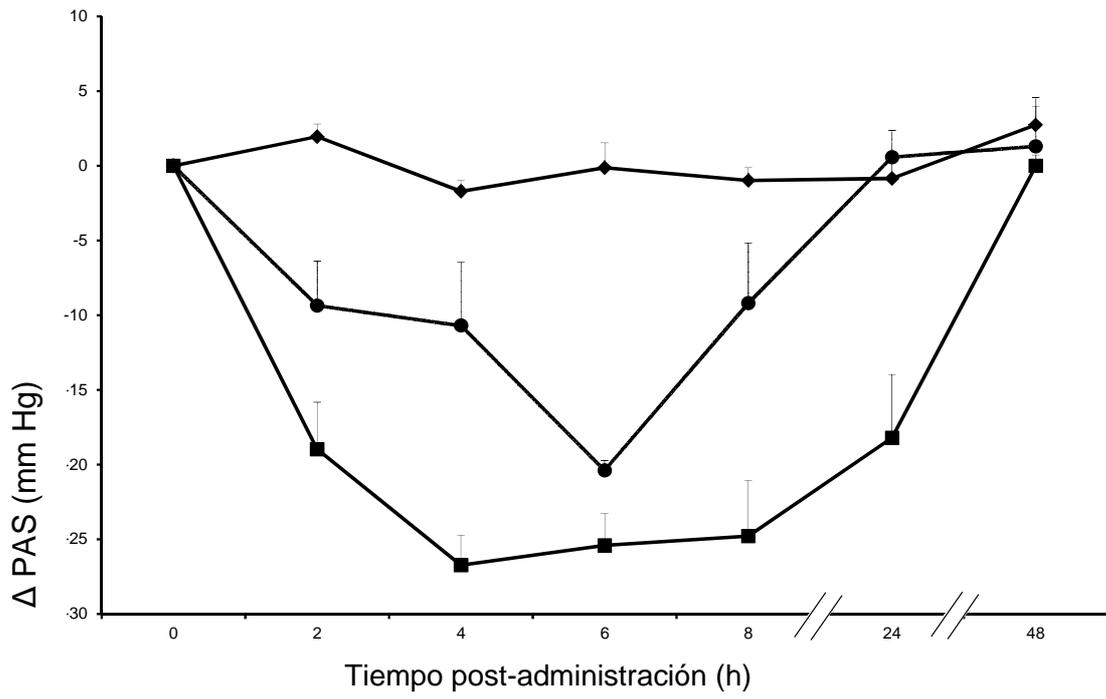


Figura 6A

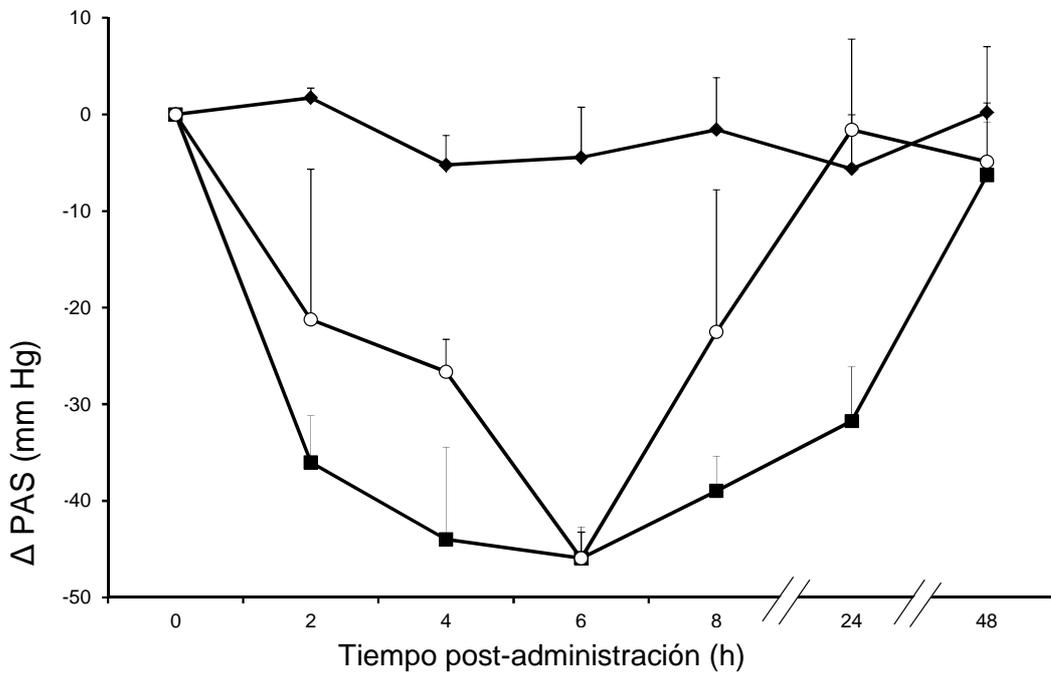


Figura 6B

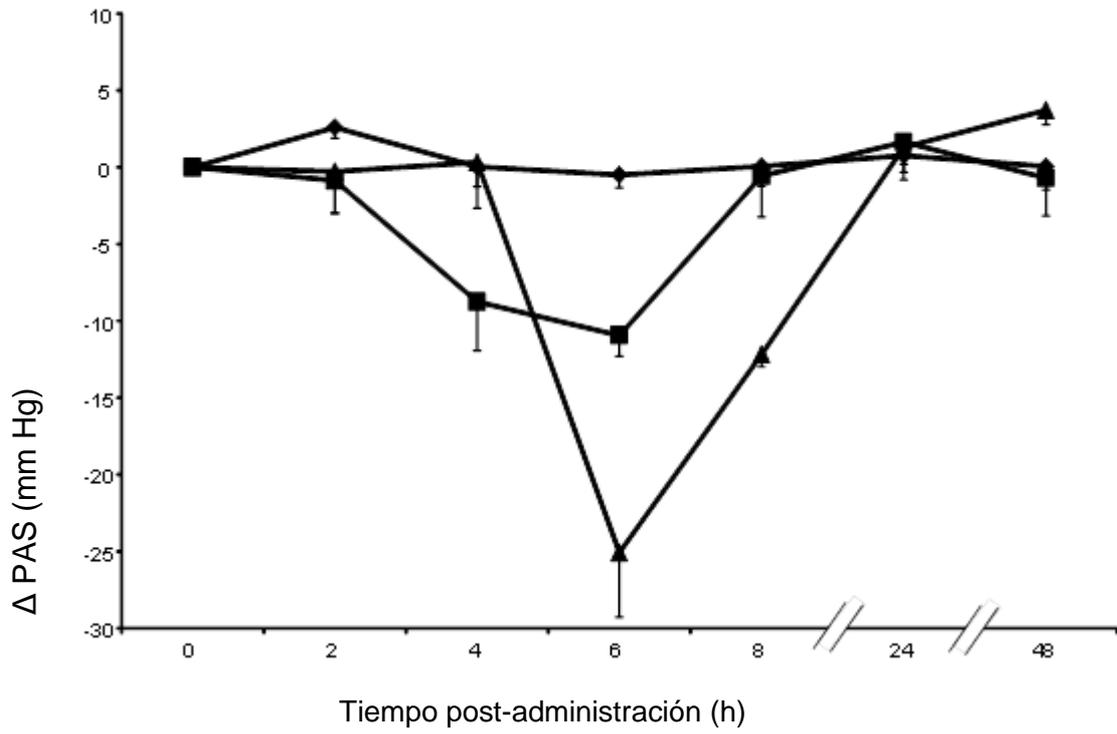


Figura 7

Lista de Secuencias

<110> UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

<120> PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE UN HIDROLIZADO ENZIMÁTICO CON ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA, HIDROLIZADO OBTENIDO Y PÉPTIDOS.

<130> P2015/3452

<160> 10

<170> BISSAP 1.3

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 1

Val Gly Lys Pro Gly Ala Arg Ala Pro Met Tyr
1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 2

Gln Val Gly Pro Leu Ile Gly Arg Tyr Cys Gly
1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 3

Leu Gly Ile His Pro Asp Trp Gln Phe Val
1 5 10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 4

Ala Val Phe Gln His Asn Cys Gln Glu
1 5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 5

Leu Ser Glu Thr Val Val
1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 6

Leu Ser Gly Pro Val Lys Phe
1 5

<210> 7

<211> 6
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 7
Ala Val Lys Ile Leu Pro
1 5

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 8
Val Arg Trp Glu Pro Ala Pro Gly Pro Val
1 5 10

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 9
Asn His Ile Asp Asp Ile Ala Gly Thr Leu
1 5 10

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<220>
<223> JP H42 64098

<400> 10
Gln Lys Pro Lys Asn
1 5



- ②① N.º solicitud: 201531372
②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.09.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SAIGA, A. et al. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Octubre 2008, Vol. 56, Nº 20, páginas: 9586 - 9591. ISSN 0021-8561 <Doi:10.1021/jf072669w> Especialmente: página 9587, apartado "Materiales y Métodos", columna izquierda; tabla 4.	1-11
A	US 6767990 B1 (CHEN YI-HONG et al.) 27/07/2004, ejemplo 1, ejemplo 2, tabla 5.	1-11
A	HUANG, S.-C. et al. Inhibition of angiotensin I - converting enzymes by enzymatic hydrolysates from chicken blood. Journal of Food and Drug Analysis. Diciembre 2010, Vol. 18, Nº 6, páginas: 458-463. ISSN 1021-9498. Especialmente apartado "Materiales y Métodos", epígrafe II.	1-7
A	Base de datos Genbank. Chicken alpha-A and alpha-D genes for alpha-A and alpha-D globin. Número de acceso X59989.1 [en línea] 14.11.2006 [recuperado el 20.12.2016] Recuperado de Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X59989>	4, 7

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
21.12.2016

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K7/06 (2006.01)

A61K38/01 (2006.01)

A61K38/10 (2006.01)

A61P9/12 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPES, TXPEPEA, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPW0EA, UNIPROTKB, NRPL1, UNIPARC, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.12.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SAIGA, A. et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Octubre 2008, Vol. 56, Nº 20, páginas: 9586 - 9591.	22.10.2008
D02	US 6767990 B1	27.07.2004
D03	HUANG, S.-C. et al. Journal of Food and Drug Analysis. Diciembre 2010, Vol. 18, Nº 6, páginas: 458-463.	12.2010
D04	Base de datos Genbank. Número de acceso X59989.1	14.11.2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA****1.1. REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 3**

Los documentos D01 a D03 divulgan procedimientos de obtención de un hidrolizado enzimático de diverso material procedente del pollo, con actividad antihipertensiva.

En el caso de D01, el procedimiento comprende (ver página 9587, columna izquierda de "Materiales y Métodos"):

- a) extraer el colágeno de las garras de patas de pollo;
- c) enfriar la disolución anterior a 50°C y realizar una hidrólisis enzimática durante un tiempo de entre 4 y 24 h con las enzimas proteolíticas proteasa FP, proteasa A amanano G y proteasa N;
- d) evaluar de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina y
- e) seleccionar un hidrolizado con actividad inhibidora.

El procedimiento descrito en D02 comprende (ver ejemplos 1 y 2):

- c) hidrolizar huesos de pollo en una mezcla enzimática con las enzimas proteolíticas de *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens* identificadas como E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28 (llamadas en D02 protamex) junto con la neutrasa, a 62°C durante 2 horas, y realizar una segunda hidrólisis enzimática;
- d) evaluar de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina y
- e) seleccionar un hidrolizado con actividad inhibidora.

D03 anticipa un procedimiento comprende (ver apartado II de "Materiales y Métodos"):

- a) obtener sangre de pollo y extraer las proteínas;
- c) realizar una hidrólisis enzimática a 50°C durante un tiempo de entre 2 y 5 h con las enzimas proteolíticas alcalasa, prozyme 6, proteasa N;
- d) evaluar de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina y
- e) seleccionar un hidrolizado con actividad inhibidora.

Así pues, una de las principales diferencias entre la solicitud y los documentos citados, es que en ninguno de los documentos el material de partida es la garra de pata de pollo. Además, tampoco realizan la etapa b), previa a la hidrólisis enzimática, en la que se ajusta la solución a un pH entre 3 y 10, siendo el valor de pH distinto al del material de partida en al menos 0,5, y se calienta dicha solución entre 80 y 120°C durante entre 60 y 90 min. Por último, ni en D01 ni en D03 se utilizan las enzimas proteolíticas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* identificadas como E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28 en la hidrólisis, y en D02 sí se utilizan estas enzimas, pero junto con otras.

Por estos motivos, se considera que ninguno de los documentos citados, considerados de manera individual o en combinación, apunta a la optimización de un procedimiento para la obtención de un hidrolizado enzimático con actividad antihipertensiva, como el indicado en la reivindicación 1.

En consecuencia, se entiende que la reivindicación 1 es nueva y tiene actividad inventiva, de acuerdo con lo establecido en los artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.

Las reivindicaciones 2 y 3 dependen de forma directa de la reivindicación 1, que cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva. Por lo tanto, las reivindicaciones 2 y 3 cumplen a su vez dichos requisitos (art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986).

1.2. REIVINDICACIONES DE LA 4 A LA 11

D01 (ver tabla 4) y D02 (tabla 5) obtienen un hidrolizado enzimático cuyos péptidos no presentan una identidad relevante respecto a los de secuencias SEQ ID NO: 1-9 de la invención.

Por otro lado, D04 divulga la secuencia de la hemoglobina de gallo, presentando la subunidad alfa-D, del aminoácido 72 al 81, un 100% de identidad con el péptido de secuencia SEQ ID NO 9. Sin embargo, no se apunta a que los péptidos derivados de esta proteína tengan función antihipertensiva.

Por estos motivos, se entiende que el hidrolizado enzimático que comprende los péptidos de secuencias SEQ. ID. NO: 1-9 (reivindicación 4); sus usos (reivindicaciones 5 y 6); la composición farmacéutica que contiene los péptidos de secuencias SEQ. ID. NO: 1-9 (reivindicación 7); los péptidos de secuencias SEQ. ID. NO: 2 ó 4 (reivindicación 8); su uso (reivindicación 9); y la composición farmacéutica o suplemento alimenticio que comprende un péptido de secuencia SEQ. ID. NO: 2 ó 4 (reivindicaciones 10 y 11) son nuevos y tienen actividad inventiva, de acuerdo con lo establecido en los artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.

2. CONCLUSIÓN

Se considera que las reivindicaciones de la 1 a la 11 satisfacen los requisitos de patentabilidad establecidos en el art. 4.1 de la Ley de Patentes 11/1986.