

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 144**

51 Int. Cl.:

**A61K 33/26** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 7/06** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2008 PCT/US2008/086668**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2009 WO09079401**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2008 E 08861633 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2231171**

54 Título: **Composiciones y métodos para incrementar la absorción de hierro**

30 Prioridad:

**14.12.2007 US 13873 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**29.03.2017**

73 Titular/es:

**HOFSETH BIOCARE ASA (100.0%)  
Molovegen 6  
6004 Alesund, NO**

72 Inventor/es:

**FRAMROZE, BOMI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 607 144 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para incrementar la absorción de hierro

### 5 Campo

La presente invención se refiere a un incremento de la absorción de hierro. La presente invención se refiere también a composiciones que comprenden hierro y péptidos obtenidas mediante hidrólisis enzimática. La presente invención se refiere también a promover que un ser humano o un animal ingieran péptidos obtenidos de vertebrados marinos enzimáticamente hidrolizados.

### Antecedentes

El hierro es esencial para la fisiología humana y animal. La insuficiencia de hierro en seres humanos y animales puede provocar una serie de enfermedades y trastornos, que incluyen anemia por deficiencia de hierro y retraso en el crecimiento.

La práctica actual para proporcionar hierro adicional es mediante inyección.

Para seres humanos están disponibles complementos de hierro en forma de píldora.

El documento JP 5229959 divulga una composición que acelera la absorción de hierro que comprende ESP-2 y DAN-1 obtenidos de músculo de sardina, en lugar de los péptidos usados en la composición de la presente invención que se derivan de la espina dorsal y la cabeza de un salmón.

### Sumario

La invención proporciona:

1. Una composición para su uso en el incremento de la absorción de hierro cuando es ingerida por un ser humano o un animal, comprendiendo dicha composición hierro y péptidos, en la que:
  - (a) los péptidos se obtienen de espinas dorsales y cabezas de salmón hidrolizadas enzimáticamente;
  - (b) la composición es adecuada para ingestión humana o animal; y
  - (c) los péptidos son más de un 50 % de la composición.
2. La composición para el uso de 1, en la que los pesos moleculares de los péptidos son de 3500 Daltons o inferiores.
3. La composición para el uso de 1 o 2, en la que el hierro es más de un 0,01 % de la composición.
4. La composición para el uso de cualquiera de 1 a 3, que comprende además aceite de pescado.
5. La composición para el uso de cualquiera de 1 a 4, en la que la composición es un complemento dietético o un aditivo alimentario.
6. La composición para el uso de cualquiera de 1 a 5, en la que menos del 50 % de los péptidos están quelados al hierro. El animal es un mamífero o un ave.
7. La composición de cualquiera de 1 a 6 para su uso en el tratamiento de un ser humano o un animal que tiene anemia por deficiencia de hierro o que está en riesgo de tener anemia por deficiencia de hierro y que no tiene una dieta que esté modificada debido a una enfermedad o trastorno.

### Descripción detallada

En un aspecto de la invención, se proporcionan composiciones para incrementar la absorción de hierro que comprenden péptidos obtenidos de proteínas de pescado hidrolizadas enzimáticamente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "incrementar la absorción de hierro" tiene el significado habitual en la técnica. De acuerdo con esto, "incrementar la absorción de hierro" incluye incrementar la absorción intestinal de hierro al torrente sanguíneo. Como ejemplo adicional, el término incluye incrementar la captación o almacenamiento de hierro en las células o en las proteínas de transporte. El incremento de la absorción de hierro se puede medir mediante varios medios conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, la absorción de hierro se puede medir ensayando los niveles de transferrina o ferritina.

Tal como se usa en el presente documento, el término "hierro" tiene el significado habitual en la técnica en el contexto del hierro que es ingerido por seres humanos o animales. De acuerdo con esto, el término incluye hierro hemo, hierro no hemo, hierro elemental (también conocido como hierro reducido), hierro complejo, hierro quelado, sales de hierro y otras formas de hierro que son adecuadas para la ingestión humana o animal. Se puede obtener hierro para ingerir a partir de numerosas fuentes conocidas por experto en la materia. Por ejemplo, se puede obtener hierro para ingerir a partir de fuentes alimentarias animales, tales como carne roja, pescado o carne de ave. Tal tipo de hierro se denomina comúnmente hierro hemo. También se puede obtener hierro para ingerir a partir de fuentes alimentarias vegetales, tales como verduras y frutas. Tal tipo de hierro se denomina comúnmente hierro no hemo. También se puede obtener hierro para ingerir a partir de fuentes microbianas, por ejemplo, de algas verdes.

También se puede obtener hierro para ingerir a partir de fuentes no orgánicas. Por ejemplo, sales de hierro ferrosas o férricas son una fuente de hierro ingerible, por ejemplo, sulfato ferroso, fumarato ferroso, succinato ferroso, gluconato ferroso, lactato ferroso, glutamato ferroso, y glicina ferrosa. Asimismo, se puede usar polvo de hierro elemental como fuente de hierro ingerible. Adicionalmente, se puede obtener hierro de las mismas fuentes que los péptidos descritos en el presente documento. Por ejemplo, tanto el hierro como los péptidos se pueden obtener a partir de pescado, por ejemplo, de salmón del Atlántico norte (por ejemplo, *Salmo salar* y otros peces de este género).

En un aspecto de la invención, el hierro en las composiciones es más del 0,01 % de la composición. Por ejemplo, en el caso de una composición que tiene un peso seco total de 1 kilogramo, el peso seco de hierro sería mayor de 100 miligramos. En un aspecto adicional de la invención, el porcentaje de hierro es más del 10 % de la composición total. En un aspecto adicional de la invención, el porcentaje de hierro en la composición es del 0,01 % al 10 % de la composición total y en un aspecto adicional, el porcentaje de hierro es más del 0,05 %, más del 0,1 %, y más del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 % de la composición total.

Tal como se usa en el presente documento, el término "péptidos" tiene el significado habitual en la técnica. De acuerdo con esto, péptidos incluyen péptidos diméricos, péptidos multiméricos y polipéptidos. En un aspecto de la invención, los pesos moleculares de los péptidos son inferiores a 60 000 Daltons. En un aspecto adicional de la invención, un 100 % o al menos un 90 % de los péptidos tienen un peso molecular inferior a 10 000 Daltons. En otro aspecto de la invención, al menos un 70 % de los péptidos tienen un peso molecular inferior a 5000 Daltons. En otro aspecto de la invención, al menos un 50 % de los péptidos tienen un peso molecular inferior a 1000 Daltons. En otro aspecto de la invención, el 100 % de los péptidos tienen un peso molecular de 3500 Daltons o inferior.

En un aspecto de la invención, la cantidad de péptidos en las composiciones es más del 50 % de la composición. En otro aspecto de la invención, la cantidad de péptidos es más del 75 %, más del 90 % o más del 99 % de la composición. De modo alternativo, en otro aspecto de la invención, la cantidad de péptidos es más del 50-99 % de la composición o más de cualquier porcentaje entero entre el 50 y el 99 %. De acuerdo con esto, en un ejemplo no limitante, un aspecto de la invención incluye una composición que tiene un peso seco total de 1 kilogramo, en el que el peso seco total de péptidos en la composición es mayor de 500 gramos, es decir, más del 50 % del peso seco total de la composición. En otro aspecto de la invención, el porcentaje se basa en la cantidad calórica. De acuerdo con esto, como ejemplo no limitante, un aspecto de la invención incluye una composición que tiene un contenido calórico total de 1000 calorías en la que el contenido calórico de los péptidos es superior a 500 calorías, esto es, más del 50 % del contenido calórico total de la composición.

Tal como se usa en el presente documento, el término hidrólisis enzimática de proteínas tiene el significado habitual en la técnica. De acuerdo con esto, la invención incluye péptidos que resultan de una hidrólisis parcial.

Con respecto a los aspectos de la hidrólisis enzimática de la invención, diversas enzimas para la hidrólisis de proteínas (conocidas también en la técnica como enzimas proteolíticas o proteasas) están disponibles para el experto en la materia. Por ejemplo, se pueden usar endopeptidasas y/o exopeptidasas. Adicionalmente, se pueden usar las siguientes enzimas o combinaciones de las siguientes enzimas: Alcalase®, Neutrase®, Protamex®, Flavourzyme® (todas disponibles en Novozymes), Pescalase® (disponible en Gistbrocades de Holanda) y Promo 31® (disponible en Biocatalysts Ltd. de Gales). Un ejemplo de una combinación de enzimas que se puede usar es una mezcla de dos enzimas Alcalase® y Neutrase® en una relación 1:9 a 1:1.

Métodos adicionales de hidrólisis enzimática son conocidos en la técnica.

Además, descripciones de hidrólisis enzimáticas y aminoácidos de pescado obtenidos mediante hidrólisis enzimática se encuentran, por ejemplo, en la solicitud de patente publicada en Estados Unidos, número de publicación: US 2005/0037109 A1 de Soerensen et al.

Además de los péptidos y el hierro, las composiciones de la invención pueden incluir también compuestos tales como vitaminas, minerales, nitrógeno no proteico, carbohidratos u otros compuestos asociados a la hidrólisis enzimática.

En un aspecto adicional de la invención, las composiciones incluyen lípidos además de los péptidos y el hierro. Por ejemplo, se pueden usar aceites de pescado en combinación con los péptidos a fin de incrementar la absorción de hierro en seres humanos y animales. En un aspecto adicional de la invención, se puede usar aceite de pescado obtenido de la misma fuente que los péptidos de pescado. En otro aspecto de la invención, sin embargo, se evitan los aceites con altos niveles de ácidos grasos oxidados ya que la oxidación de los ácidos grasos disminuye generalmente la palatabilidad. En un aspecto adicional de la invención, el nivel de insaturación en los lípidos usados está por debajo de una cantidad predeterminada.

En un aspecto adicional de la invención, el hierro o los péptidos, o la combinación de los dos, son complementos dietéticos o aditivos alimentarios. El término "complemento dietético" o "aditivo alimentario" se refiere al significado habitual que tienen estos términos en la técnica. De acuerdo con esto, un complemento dietético o un aditivo alimentario significa que los péptidos o el hierro se obtienen de una fuente aparte de la dieta humana o animal. Asimismo, un complemento dietético o un aditivo alimentario se procesan frecuentemente de un modo distinto o separadamente de la comida o alimento y se envasa con frecuencia en envases separados de la comida o alimento. Los complementos dietéticos o aditivos alimentarios pueden tener también una composición química diferente. Por ejemplo, el hierro como complemento dietético o aditivo alimentario está normalmente en forma de sulfato ferroso en comparación con el hierro encontrado en la comida o alimento que está normalmente en forma de hierro hemo de la carne. Se puede formular un alimento de prescripción para mascotas (para un animal de compañía) de acuerdo con la presente invención. Tal alimento de prescripción normalmente es para mascotas de edad avanzada cuya absorción nutricional llega ser problemática.

Aparte de a los seres humanos, particularmente aquellos que padecen o están en riesgo de padecer una anemia situacional (en la que existen problemas nutricionales, por ejemplo), se pueden proporcionar las composiciones de la presente invención a otros animales. Tales animales incluyen animales de producción tales como cerdos {y otros porcinos), pollos (y aves de corral), vacas y ganado (bovinos) y otros de tales animales. Son de particular interés animales que tienen o están en riesgo de tener una anemia situacional, tal como cerditos destetados y otros animales en edad de crecimiento o en desarrollo tales como los enumerados anteriormente (terneros, por ejemplo). La formulación de la presente invención puede ser apetitosa para tales animales incluso aunque el pescado no sea parte de su dieta natural (al contrario que los visones, por ejemplo, los cuales comen pescado de modo natural).

En un aspecto adicional de las composiciones de la invención, menos del 50 % del hierro está quelado a los péptidos. En un aspecto adicional, el porcentaje de quelación del hierro a los péptidos es de menos de un 50 % a un 0 % y, en otro aspecto, menos de cualquier porcentaje entero entre el 50 % y el 1 %.

Con respecto a la composición de la invención, se pueden calcular las cantidades de diversos modos alternativos, por ejemplo, peso/volumen (p/v), volumen/peso (v/p), volumen/volumen (v/v) o peso/peso (p/p). Además, las cantidades se pueden calcular basándose en los porcentajes calóricos. Tal como se usa en el presente documento, las cantidades y los porcentajes incluyen tales cantidades y porcentajes medidos mediante cualquier metodología que pueda ser aplicada razonablemente por el experto en la materia. Por ejemplo, una composición que tiene más de un 50 % de péptidos, tal como se ha expuesto en el presente documento, incluye composiciones que tienen más de un 50 % de péptidos basándose en el peso seco de los péptidos con respecto al peso seco de la composición total, así como a composiciones que tienen un 50 % de péptidos basándose en otras metodologías de cálculo conocidas por el experto en la materia, tal como el peso de los péptidos con respecto al volumen de la composición total (p/v) en el caso de una composición líquida. De acuerdo con esto, en otro aspecto de la invención, la cantidad de péptidos, medida mediante cualquiera de los métodos de cálculo mencionados anteriormente, es más del 50 %. Lo anterior se aplica a todas las cantidades y los porcentajes expuestos en el presente documento, que incluyen las cantidades y los porcentajes de péptidos, hierro y péptidos quelados.

En otro aspecto de la invención, las composiciones de la invención no contienen cantidades significativas de compuestos tales como el óxido de trimetilamina, que inducen la formación de hidratos de óxido de hierro cristalinos insolubles, lo cual puede inhibir la absorción de hierro.

Las composiciones de la invención se dirigen al incremento de la absorción de hierro en un ser humano o un animal. En un aspecto de la invención, se promueve que un ser humano o un animal ingieran los péptidos. En un aspecto adicional de la invención, los péptidos se ingieren conjuntamente con el hierro o separadamente. En otro aspecto, el hierro se ingiere un tiempo razonable antes o después de la ingestión de los péptidos. En un aspecto adicional, el hierro se ingiere menos de 24 horas antes o después de la ingestión de los péptidos. En un aspecto adicional de la invención, el hierro se ingiere de menos de 24 horas a menos de 1 hora (y cualquier intervalo de horas entremedias) antes o después de la ingestión de los péptidos.

En un aspecto de la invención, las composiciones de la invención mejoran enfermedades y trastornos que resultan de la insuficiencia de hierro en un ser humano o un animal. El más común de estos trastornos es quizás la anemia por deficiencia de hierro. La anemia es un trastorno que se caracteriza por una deficiencia de glóbulos rojos. La anemia por deficiencia de hierro es una anemia que está causada por una cantidad inadecuada de hierro. La deficiencia de hierro puede ser el resultado de cantidades inadecuadas del hierro ingerido, una absorción inadecuada de hierro, pérdida de sangre o una combinación de los mismos.

La anemia por deficiencia de hierro también es común en seres humanos o animales durante periodos de crecimiento, tales como la infancia o el destete. También se ha encontrado anemia por deficiencia de hierro en razas de ganado que tienen una elevada relación de crecimiento con respecto a la alimentación.

5 La anemia por deficiencia de hierro se puede distinguir de muchas otras anemias. Por ejemplo, la anemia por deficiencia de hierro es diferente de la anemia resultante de trastornos malignos, inflamatorios o infecciosos crónicos, tales como la artritis o el cáncer. Más específicamente, las anemias siguientes son distintas de la anemia por deficiencia de hierro: anemia hipocrómica, anemia microcítica, clorosis, anemia sideroblástica hereditaria, anemia sideroblástica idiopática adquirida, aplasia de eritrocitos, anemia megaloblástica, tal como anemia perniciosa, anemia por deficiencia de vitamina B12 y anemia por deficiencia de ácido fólico, anemia aplásica, anemias hemolíticas, tales como anemia hemolítica autoinmune, anemia hemolítica microangiopática, y hemoglobinuria paroxística nocturna.

15 Asimismo, en otro aspecto de la invención, la anemia por deficiencia de hierro no incluye la anemia resultante de fallo renal, función renal disminuida o diálisis.

20 Tal como se ha mencionado anteriormente, los péptidos ingeridos incrementan la absorción del hierro en seres humanos o animales. En un aspecto adicional de la invención, los péptidos ingeridos incrementan sustancialmente la absorción del hierro en un ser humano o un animal. En aspectos adicionales de la invención, la absorción de hierro se incrementa en una cantidad significativamente estadística y en un aspecto adicional la absorción se incrementa en un 50 % hasta más de un 100 %. En un aspecto adicional, la absorción de hierro se incrementa en un porcentaje que es mayor que cualquier porcentaje entero entre el 50 % y el 100 %. Tal como se ha mencionado anteriormente, un incremento de la absorción de hierro se puede evaluar midiendo la transferrina o la ferritina o mediante otros métodos conocidos por el experto en la materia.

25 Con referencia a otros aspectos de las composiciones de la invención, el término "ingerir" tiene el significado habitual en la técnica. La ingestión normal se efectúa por la boca. No obstante, se pueden usar también otros métodos de ingestión tal como mediante un tubo nasogástrico. Asimismo, además de la ingestión, en un aspecto adicional de la invención, se pueden administrar complementos de hierro por vía intravenosa.

30 En un aspecto adicional de la invención, la ingestión la efectúa un ser humano o un animal con una dieta proteica normal. El término "normal" en el presente documento tiene el significado habitual en la técnica en el contexto de normal frente a una dieta que ha sido modificada debido a una enfermedad o trastorno. Por ejemplo, un ser humano o un animal que padece una disfunción renal no tiene con frecuencia una dieta proteica normal debido a que tal sujeto no puede metabolizar adecuadamente las proteínas.

35 La expresión "adecuado para ingestión humana o animal" se refiere al significado habitual en la técnica de esta expresión. Por ejemplo, "adecuado para ingestión humana o animal" se refiere a una cantidad aceptable, para la seguridad humana o animal, de patógenos y toxinas (en el caso de toxinas, por ejemplo, mercurio y otros metales pesados).

45 Por ejemplo, es conocido por el experto en la materia que los niveles de determinados patógenos han de estar por debajo de una cantidad predeterminada para que una composición sea adecuada para ingestión humana o animal. Por ejemplo, en el contexto de los microorganismos patógenos, y en un aspecto de la invención, la cantidad de determinados patógenos (como es conocido por el experto en la materia) debe estar por debajo de una Dosis mínima infectiva (DMI). La DMI se refiere al número mínimo de microorganismos patógenos capaces de causar una enfermedad. Por ejemplo, la DMI para *Vibrio cholerae*, un contaminante microbiano patógeno encontrado en alimentos derivados de pescado, es de  $10^6$ . De acuerdo con esto, en un aspecto de la invención, las composiciones del presente documento contienen *Vibrio cholerae* por debajo de su DMI.

50 Además del *Vibrio cholerae*, los siguientes patógenos son conocidos por el experto en la materia y en un aspecto adicional de la invención, las composiciones que contienen cantidades de estos patógenos por debajo de sus respectivas DMI. *Salmonella spp.*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, otras cepas de *Vibrios*, y varias cepas de *E coli*.

55 Análogamente, en otro aspecto de la invención, las composiciones contienen un nivel de virus, protozoos y parásitos patógenos tal que las composiciones se consideran adecuadas para la ingestión humana o animal.

60 Asimismo, métodos para conseguir los niveles reducidos deseados de patógenos son conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, cocción, enfriamiento, irradiación (por ejemplo de rayos X o rayos gamma), calentamiento, calentamiento a presión, congelamiento o una combinación de estos son conocidos por el experto en la materia por ser seguros y eficaces para reducir los niveles de patógenos de las composiciones que van a ser ingeridas por seres humanos o animales.

65 Como otro ejemplo, es conocido por el experto en la materia que la reducción del tamaño (peso molecular) de los péptidos en una composición es un modo común de minimizar el riesgo de infección por priones. De acuerdo con

esto, en un aspecto de la invención, los péptidos tienen los pesos moleculares expuestos anteriormente.

La anterior descripción y los ejemplos que siguen a continuación no limitan las composiciones descritas en el presente documento y solamente sirven para ilustrar diversas realizaciones no limitantes.

5 Además, en el presente documento, el uso del singular no tiene un significado limitante. Por ejemplo, la descripción de "una composición" o "la composición" no significa que limite la invención a una sola composición. Esto es, se entiende que una composición en el presente documento, cuando se combina con otras composiciones, están aún dentro del alcance de la presente invención, a menos que se exponga explícitamente lo contrario en el presente documento.

15 Adicionalmente, las siguientes palabras se deben interpretar tal como sigue a menos que se exponga explícitamente otro significado. Las palabras "incluye", "incluyen", o "que incluye" o "que incluyen" significan incluir, sin limitación. Las palabras "comprende", "comprenden" o "que comprende" o "que comprenden" significan incluir sin limitación. La palabra "o" significa y/o.

### Ejemplos

20 Para los Ejemplos 1 y 2, se recogió sangre de seis perros alimentados con un 20 % de hidrolizado de proteínas de salmón (SPH), seis perros alimentados con un 20 % de hidrolizado de proteínas de salmón y un 4,5 % peso/peso (p/p) de aceite de salmón (SPHO) y seis perros de control. Todos los perros se alimentaron con la dieta control que consistía en un 30 % de proteína de un derivado de ave y un 25 % de grasa, desde el día uno hasta el día catorce. Los perros no de control se alimentaron con el SPH y el SPHO desde el día quince hasta el día veintiséis solamente. Los seis perros de control se alimentaron con la dieta de control sin los aditivos alimentarios anteriores.

25 Los ejemplos 1 y 2 se centran en estudios del efecto fisiológico sobre una serie de ensayos *in vitro*. Los ejemplos descubren cambios de la concentración en plasma basados en marcadores enzimáticos. Los dos ensayos *in vitro* juntos investigan la presencia potencial de péptidos bioactivos de los alimentos con SPH y el SPHO que influyen en la concentración de hierro almacenado en los sujetos alimentados. Los dos ensayos *in vitro* se dirigen a la transferrina y la ferritina. El primer ensayo (Ejemplo 1) se dirigen a la transferrina, el segundo ensayo (Ejemplo 2) se dirige a la ferritina.

#### Ejemplo 1

35 Se midieron los niveles de transferrina sérica de los perros. El ensayo usado para medir los niveles de transferrina fue un ensayo de ELISA. Este ensayo es un inmunoensayo ligado a enzimas de dos sitios para medir la transferrina sérica o plasmática de los perros. La medición de la transferrina sérica tiene un valor particular en la identificación de la eficacia de la absorción de hierro, especialmente cuando se acopla a la medición simultánea de los niveles de ferritina plasmática.

40 La transferrina es una proteína que se une al hierro. La transferrina sirve para transportar el hierro hasta la médula ósea y los órganos de almacenamiento tisular, tal como el hígado. La transferrina también participa en la regulación y el control de la absorción de hierro y protege frente a la intoxicación por hierro.

45 Los resultados de los ensayos de la transferrina se resumen en la Tablas 1 y 2.

TABLA 1: Concentración de transferrina promedio corregida (mg/l)

Perro	1	2	3	4	5	6
SPHO	1,642	1,874	1,480	1,503	1,317	1,341
SPH	2,570	2,686	2,686	2,593	2,338	2,199
Control	2,988	4,449	4,148	3,591	3,243	2,709

TABLA 2: Concentración de transferrina promedio corregida (mg/l)

	Desviación típica	Media	Error típico de la media
SPHO	0,223	1,526	0,091
SPH	0,221	2,512	0,090
Control	0,696	3,023	2,84

50

## Ejemplo 2

La ferritina es una proteína que se une al hierro implicada en el almacenamiento de hierro. La ferritina se localiza en diversos tejidos, por ejemplo, hígado, bazo, médula ósea y moco del intestino.

5

Los resultados de los ensayos de la ferritina se resumen en la Tablas 3 y 4.

TABLA 3: Concentración de ferritina promedio corregida (mg/l)

Perro	1	2	3	4	5	6
SPHO	277,543	267,799	246,920	324,173	335,308	271,279
SPH	221,169	147,397	248,312	230,217	291,462	270,583
Control	113,294	131,389	265,711	298,422	146,701	141,829

10

TABLA 4: Concentración de ferritina promedio corregida (mg/l)

	Desviación típica	Media	Error típico de la media
SPHO	38,457	287,171	15,700
SPH	55,441	234,857	22,634
Control	78,877	164,009	32,201

## Discusión de los resultados

El uso de las concentraciones de transferrina y ferritina para afirmar la influencia del SPH y el SPHO sobre la absorción de hierro. Los resultados muestran que el SPHO y el SPH incrementan las concentraciones de ferritina en plasma y disminuyen las concentraciones de transferrina en plasma. El incremento de la ferritina sugiere un incremento de la absorción y/o la biodisponibilidad del hierro. Análogamente, la disminución de la concentración de transferrina sugiere una reducción del transporte de hierro. La disminución de la concentración de transferrina sugiere también una reducción de la necesidad de absorción del hierro debida a (se hipotetiza) un incremento de la biodisponibilidad del hierro y/o un incremento de las concentraciones de ferritina unida al hierro. La disminución de la concentración de transferrina y el incremento de la concentración de ferritina apoyan la conclusión de que la biodisponibilidad y la absorción del hierro se incrementaron en los perros alimentados con SPHO y SPH con relación a los perros control.

La disminución de la concentración de transferrina mostraba una significancia estadística. El incremento de la concentración de ferritina mostraba una tendencia, pero técnicamente no era estadísticamente significativa debido a la dispersión de los niveles de concentración individuales a lo largo de los tres grupos de perros.

## Ejemplo 3

Mediciones de la captación del hierro por células Caco-2 usando PP1 SP Seco en comparación con el producto de digestión de proteínas de carne, pollo, pescado y caseína.

Se sometieron a hidrólisis proteica cabezas y espinas dorsales de salmón, tras haber fileteado el salmón total, usando un proceso de fabricación desarrollado por Green Earth Industries (GEI). Véase, por ejemplo, el documento US 2005/0037109. Este proceso da una fracción proteica soluble en agua (SP), una fracción proteica insoluble (NSP), una fracción de aceite (FO) y una fracción de espinas (CA). Estas fracciones se pueden separar entre sí con particular atención a la calidad global y las separaciones para la fracción SP. La fracción SP se aísla primero del proceso en forma de una solución del 6-7 %, que se concentra hasta una suspensión del 55-60 % en un evaporador de película descendente de triple efecto. Este material parecido a la miel se seca posteriormente, usando un equipo de secado por pulverización, para dar un polvo de proteína amarillo pálido (SP Seco).

Se alimentó a los perros con el SP Seco en un estudio de digestibilidad y palatabilidad efectuado por GEI, y el plasma se recogió y se analizó. Este mostró un incremento significativo en ferritina y una disminución en proteínas transferrina, lo que es indicativo de un incremento de la captación del hierro en los animales que recibieron el SP Seco del ensayo y el SP Seco + la fracción de aceite de salmón.

La absorción de hierro por modelos animales (tales como perros o cobayas) ofrece una evaluación directa y fisiológicamente relevante de la biodisponibilidad del hierro. Los presentes inventores demostraron también la captación del hierro potencial del "SP Seco" usando un método *in vitro* de captación de hierro por células Caco-2 ("Iron availability from Iron-Fortified Sprulina by an in-vitro digestion/Caco-2 Cell Culture Model". Jean-Max Rouanet et al., *Journal of Agric, Food Chem.* 49(3), 1625, (2001) para estimar rápidamente el incremento potencial de la

captación del hierro mediante la incorporación del SP Seco en la dieta.

Este estudio se emprendió para analizar el rendimiento del SP Seco para potenciar la captación del hierro, en comparación con la caseína, y proteínas de soja, carne, pollo y pescado tras un proceso de digestión péptica e intestinal simulada.

Este estudio con células Caco-2 combina la digestión péptica e intestinal simulada y la medición de la captación del hierro por una monocapa de células Caco-2.

La muestra PP1 SP Seco de hidrolizado de proteínas solubles se produjo bajo la supervisión de Meatzyme B.V. y Green Earth LLC. La fracción de proteínas solubles se secó mediante pulverización y se recibió en Bombay, India, en buenas condiciones para el análisis químico. La muestra PP1 SP Seco es un polvo amarillo pálido amorfo con un ligero olor a pescado.

Las muestras de proteínas de carne (buey), pollo (muslo) y pescado (filete de atún) se adquirieron frescas y se trataron como sigue. Se eliminó toda la grasa y tejido conectivo visible y se cortaron en finas rodajas. Tras hervirlas a fuego lento en agua desionizada durante 30 minutos, se retiraron las piezas, se enfriaron a 0 °C y se eliminó la grasa visible adicional. Las piezas se homogeneizaron en una mezcladora con un mínimo de agua, se liofilizaron y se pasaron a través de un tamiz de 40 mallas para dar los polvos de proteína usados en el presente documento. La caseína se adquirió en la Parsi Dairy Farm Ltd. y se usó como tal.

La digestión *in vitro* de las cuatro fuentes de proteínas anteriores se llevó a cabo usando pepsina porcina y extracto biliar (para simular la digestión en el estómago) y pancreatina y extracto biliar (para simular la digestión intestinal) adquiridos en Sigma Aldrich y usados como tales en un procedimiento de digestión convencional. Se usó cloruro de hierro (III) marcado con <sup>59</sup>Fe para preparar las concentraciones de hierro hasta 10 µmol/l en los homogeneizados.

El contenido de proteína inicial se midió tras solubilizar en hidróxido sódico 0,5 mol/l y se usó el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad® DC.

El contenido de proteína digerida se midió como el precipitado solubilizado con TCA usando el mismo kit, en el que 20 ml de cada producto de digestión se diluyeron hasta 50 ml con agua desionizada y se hicieron reaccionar con 50 ml de ácido trifluoroacético 0,6 mol/l. Las muestras se centrifugaron y el precipitado se solubilizó en 0,5 mol/l y se midió como antes.

En este ensayo se usó una forma modificada del kit de ensayo de células Caco-2 de 24 x pocillos disponible en el mercado de Celsis In-vitro Technologies. El kit de Celsis se presembró en placas con células Caco-2 con filtros Corning Costar Transwell®. Los cultivos IVT de Caco-2 se consideran aceptables para estudios de transporte y cumplen los criterios de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de 1000 ohmios.

Se añadieron 1,5 ml de cada solución de proteínas post-digestión que contenían 10 µmol/l de <sup>59</sup>Fe a cada uno de 12 pocillos, que contenían células Caco-2 normales en la cámara inferior y las placas se incubaron a 37 °C durante dos horas antes de separar las capas.

Las células se extrajeron usando el procedimiento descrito por Celsis, y se recontó el <sup>59</sup>Fe usando un contador gamma automatizado y se determinó como la fracción remanente en el sobrenadante tras la centrifugación.

Los parámetros del contenido inicial (antes de la adición del <sup>59</sup>Fe) y la digestión estimada en porcentaje medida como la medición de proteína precipitable con TCA se muestran en la Tabla 5 que sigue.

TABLA 5 - Análisis de los homogeneizados de proteínas antes y después de la digestión

Fuente	% Proteína	Grasa cruda (mg/g)	% humedad	Hierro total	% Digestión
Carne	84 % ± 2 %	110 ± 5	6,1 ± 0,2	0,84 ± 0,01	66 % ± 5 %
Pollo	88 % ± 1 %	90 ± 5	4,9 ± 0,2	0,65 ± 0,01	68 % ± 5 %
Pescado	94 % ± 1 %	40 ± 2	6,1 ± 0,2	0,13 ± 0,01	74 % ± 5 %
Caseína	92 % ± 1 %	ND	5,8 ± 0,2	0,03 ± 0,01	88 % ± 5 %
SP Seco	93 % ± 0,5 %	36 ± 2	4,2 ± 0,2	0,007 ± 0,001	93 % ± 1 %

\*El hierro total se midió en un espectrómetro como un complejo Fe-fereno a 595 nm ("Ferene -a new spectrophotometric reagent for iron". D. D. Hennessy et al. *Can. J. Chem.* 62, P721, (1984).

Los resultados de la variación de la captación de hierro entre diferentes fuentes de proteínas se muestran en la Tabla 6 a continuación. Las fuentes de proteína muscular (carne, pollo y pescado) mostraban captaciones de hierro

similares en las células Caco-2 bajo la membrana, mientras que la caseína no mostró casi captación, que era muy similar a la solución tampón de control negativo (ósmosis). El producto SP Seco mostraba una captación de hierro significativamente mayor en comparación con todas las otras fuentes de proteínas.

5 TABLA 6 - Captación celular de hierro (nmol/mg proteína celular, tras 2 h de equilibración).

Solución tampón	Carne	Pollo	Pescado	Caseína	SP Seco
0,015 ± 0,005	0,095 ± 0,005	0,070 ± 0,005	0,085 ± 0,005	0,025 ± 0,005	0,135 ± 0,005

10 El modelo Caco-2 se ha usado con éxito para estudiar la captación de fármacos en docenas de experimentos en la literatura. ("Intestinal absorption of <sup>59</sup>Fe from neutron activated commercial oral iron (III) citrate and iron (III) hydroxide polymaltose complexes in man". (H. C. Heinrich *Arzneim-Forsch/Drug.Res.* 37, 105, (1987).) El ensayo modificado usado en el presente documento se ha usado también para estudiar el enriquecimiento de alimentos no solo con hierro, sino también con elementos esenciales tales como zinc y vitamina D. Este modelo *in vitro* ha mostrado repetidamente una comparabilidad excelente con la absorción humana en el intestino y, por tanto, los resultados mostrados en este estudio respaldan los resultados positivos del estudio del plasma en la alimentación de perros mayores de Fahey. Se puede efectuar también un estudio de modelo animal usando cobayas, por ejemplo, para estudiar adicionalmente el efecto de la alimentación con SP Seco sobre el RGR (hemoglobina).

15 Es evidente a partir de este estudio que el producto de digestión de proteínas marinas - SP Seco - muestra un efecto positivo sobre la captación del hierro en comparación con las otras fuentes de proteína digerida ensayadas. El SP Seco mejoró la captación de hierro en un 540 % respecto al control negativo de caseína y fue incluso un 40 % mayor que el control positivo, el producto de digestión de proteínas de la carne. No se usó aceite de salmón (SO) en este experimento en absoluto y, por tanto, esta es una evidencia concluyente de que la fracción de proteína potencia por sí misma un incremento de la captación del hierro.

20 Cabe señalar también que solamente se usó el hierro extrínseco añadido (10 mmol/l) para medir la captación del hierro en este experimento ya que no hay disponible un modo preciso para determinar la captación de hierro intrínseco. Por tanto, los valores mostrados representan la captación mínima que habría ocurrido en cada producto de digestión, que es una asunción similar a la hecha en los estudios humanos efectuados por Cook and Bjorn-Rasmussen.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición para su uso en el incremento de la absorción de hierro cuando es ingerida por un ser humano o un animal, comprendiendo dicha composición hierro y péptidos, en la que:
- (a) los péptidos se obtienen de espinas dorsales y cabezas de salmón hidrolizadas enzimáticamente;
  - (b) la composición es adecuada para ingestión humana o animal; y
  - (c) los péptidos son más de un 50 % de la composición.
- 10 2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que los pesos moleculares de los péptidos son de 3500 daltons o inferiores.
- 15 3. La composición para el uso de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el hierro es más de un 0,01 % de la composición.
- 20 4. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha composición comprende además aceite de pescado.
5. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición es un complemento dietético o un aditivo alimentario.
- 25 6. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que menos del 50 % de los péptidos están quelados al hierro.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en el tratamiento de un ser humano o un animal que tienen anemia por deficiencia de hierro o que están en riesgo de tener anemia por deficiencia de hierro y que no tienen una dieta que esté modificada debido a una enfermedad o un trastorno.