(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 749 717**

(21) Número de solicitud: 201830959

(51) Int. CI.:

A61K 38/01 (2006.01)
A61K 36/16 (2006.01)
A23J 3/34 (2006.01)
A23L 33/105 (2006.01)
A61P 15/10 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

04.10.2018

(30) Prioridad:

21.09.2018 ES P201830909

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

23.03.2020

(71) Solicitantes:

BIOPEPTIDE, S.L. (100.0%)
C/ Hileras, 17-4º Izquierda
28013 Madrid ES

(72) Inventor/es:

GÓMEZ SALA, Beatriz;
GÓMEZ SALA, Álvaro y
LIU, Chi-yu

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

(54) Título: **Composición y sus usos**

(57) Resumen:

Composiciones y sus usos.

La presente invención pertenece al campo de composiciones de naturaleza alimentaria, en concreto se refiere a una composición que comprende al menos un hidrolizado de proteína láctea y un extracto de Ginkgo biloba. Asimismo, se refiere a distintos usos de dicha composición, entre otros, para mejorar la función endotelial.

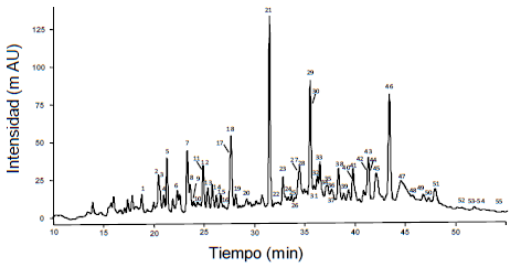

FIG. 1

ES 2 749 717 A1

DESCRIPCIÓN

Composición y sus usos

Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de composiciones de naturaleza alimentaria, en concreto se refiere a una composición que comprende al menos un hidrolizado de proteína láctea y un extracto de *Ginkgo biloba*, y a su uso, en particular para mejorar la función endotelial.

Antecedentes de la invención

En los últimos años los complementos alimenticios y los alimentos funcionales están ganado un gran interés en farmacias y en el sector alimentario. Debido a la elevada incidencia de enfermedades relacionadas con la disfunción vascular en países desarrollados, aquellos productos que mejoran la salud del endotelio tienen un creciente interés.

Cuando el endotelio vascular funciona con normalidad responde, entre otras, a distintas señales y cambios (químicas, hormonales, hemodinámicos, fuerza de rozamiento con la sangre, etc.), y ayuda a regular la coagulación de la sangre, ayuda a la respuesta inmune del cuerpo, controla el volumen de líquido y la cantidad de electrolitos y otras sustancias que pasan de la sangre a los tejidos, y produce dilatación o constricción de los vasos sanguíneos. Cuando hay disfunción endotelial, sin embargo, la capacidad de realizar una o más de estas funciones se reduce. Una de las causas principales sugerida para la disfunción endotelial es la reducción de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO, del inglés *nitric oxide*). El NO es una molécula pequeña de vida corta y naturaleza gaseosa resultante de la combinación de un átomo de oxígeno y un átomo de nitrógeno. Desde el punto de vista químico es una molécula que presenta un electrón desapareado, por lo que es altamente reactiva e inestable. El NO se sintetiza mediante conversión enzimática de L-arginina en presencia de oxígeno molecular llevada a cabo por la óxido nítrico sintasa (NOS). El NO participa en la regulación del tono vascular, en la defensa inmunitaria inespecífica y actúa también como neurotransmisor.

Hay 3 isoenzimas de la NOS que presentan diferente localización y regulación, NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) y NOS inducible (iNOS). Las isoformas eNOS y

nNOS se activan mediante la unión de la calmodulina al enzima, proceso que depende la concentración de Ca^{+2} intracelular. La eNOS se regula también por su fosforilación en respuesta al flujo pulsátil y al esfuerzo mecánico de rozamiento entre la sangre y el endotelio (*shear stress*).

A diferencia de la mayoría de las moléculas que transmiten información entre células el NO no se almacena. Se sintetiza en respuesta a un estímulo y gracias a sus propiedades físico-químicas se difunde rápidamente a través de las membranas biológicas tras lo cual reacciona con diversas dianas intracelulares. Pero la acción del NO, no depende tanto de la diana sobre la que actúe como de su concentración en el entorno intracelular en donde actúe. Este proceso está dificultado en el endotelio por la presencia de ROS (especies de oxígeno reactivo) entre las que destaca el anión superóxido que reacciona con el NO produciendo compuestos tóxicos y reduce la concentración intracelular del Ca^{+2} dificultando la activación de la eNOS.

El NO de origen endotelial se comporta como un primer mensajero que al difundirse en las membranas de las células del músculo liso vascular activa el enzima guanilato ciclasa soluble, con el correlativo aumento de guanosín monofosfato cíclico (cGMP), que actúa como segundo mensajero. El cGMP es un factor relajante del músculo liso de gran importancia en diferentes procesos de la vasodilatación y flexibilización de arterias y arteriolas.

Existen muchos trastornos caracterizados por o relacionados con la disfunción endotelial que, ademas de ser un marcador temprano del daño vascular sistémico, muchas veces aparece como consecuencia de enfermedades concomitantes que puede precederlas e incluso predecirlas. Así por ejemplo están relacionadas con la disfunción endotelial, la aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, hipertensión, hipercolesterolemia, hiperglucemia, ictus, apoplejía, infarto de miocardio, enfermedad vascular periférica, angina de pecho, insuficiencia cardiaca, disfunción ventricular diastólica y/o sistólica, macro y microangiopatía en pacientes con diabetes, lesión tisular relacionada con isquemia y reperfusión, disfunción sexual, etc.. Además, la disfunción endotelial vascular es un precedente de la hipoperfusion cerebral relacionada con diversas enfermedades neurodegenerativas, entre las que está la enfermedad de Alzheimer.

Un caso muy estudiado es el que asocia la disfunción endotelial como una causa de disfunción eréctil (DE) orgánica en hombres y de disfunción sexual femenina (DSF) orgánica

en mujeres. En las últimas décadas multitud de estudios y composiciones han sido descritas para el tratamiento de la DEEn cuanto a remedios naturales de la disfunción sexual, en particular de la DE, distintas composiciones han sido descritas comprendiendo extractos de plantas, por ejemplo, ginseng, jengibre, guaraná o maca (ver, por ejemplo, WO2008/089815, WO2012/067745). Sin embargo, existe mucha controversia en cuanto a si realmente estos productos naturales tienen o no un efecto en la mejora de la función sexual y si tienen más efecto que el placebo.

Por otra parte, se han desarrollado productos farmacéuticos que intentan mantener durante más tiempo los efectos conseguidos por las moléculas cGMP generadas por el ON. Para ello se inhibe temporalmente al enzima fosfodiesterasa 5 (PDE5), enzima que se encarga de la degradación del cGMP. Entre ellos, el citrato de sildenafilo constituyó el primer fármaco eficaz tras administración oral para el tratamiento de la DE, consiguiendo su efecto entre 25-60 minutos después de su administración oral. Sin embargo, este producto tiene importantes efectos secundarios. Los principales son cefalea, dispepsia, rinitis y alteraciones visuales, todos ellos relacionados con la inhibición de la fosfodiesterasa a otros niveles. Además, el sildenafilo está contraindicado en pacientes que reciben nitrovasodilatadores y ha de ser tomado con precaución por personas con alteraciones cardiovasculares diversas (isquemia coronaria, hipertensión, hipotensión) y con úlcera péptica activa. Nuevos derivados con selectividad relativa por la fosfodiestereasa 5 son taladafilo (Cialis®) y vardenafilo (Levitra®), cuya acción se prolonga durante más horas debido a que sus semividas son más largas, lo que permite una menor dependencia del momento de ingestión. Sin embargo, los efectos secundarios son similares a los de sildenafilo.

Así, sigue existiendo la necesidad de desarrollar composiciones que mejoren de manera eficaz la función endotelial, y sean por tanto útiles para el tratamiento de trastornos relacionados con la disfunción endotelial, y que tengan menos efectos secundarios que los tratamientos ya conocidos o ningún efecto secundario. Sorprendentemente, los autores de la presente invención han desarrollado una composición sinérgica, proveniente de productos alimentarios naturales, capaz de mejorar la función endotelial, sirviendo así para, entre otros, mejorar el rendimiento físico, tratar la DE y la DSF y actuar como coadyuvante de patologías caracterizadas por una disfunción endotelial vascular.

Objeto de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende:

a) un hidrolizado de caseína de leche caracterizado porque aumenta la expresión y/o actividad de eNOS *in vivo* y/o aumenta los niveles de arginina en plasma *in vivo* y/o tiene actividad antioxidante;

b) un extracto de *Ginkgo biloba*, y opcionalmente

c) un hidrolizado de proteínas de suero lácteo de leche caracterizado porque tiene actividad inhibidora del enzima DDP-IV *in vitro* y/o tiene actividad antioxidante.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un medicamento, un suplemento alimenticio, una bebida o un producto alimenticio que comprende una composición según el primer aspecto de la invención.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de una composición según el primer aspecto de la invención para la preparación de un medicamento, un suplemento alimenticio, una bebida o un producto alimenticio para el tratamiento de un trastorno relacionado con la disfunción endotelial. Se refiere también al uso de la composición según el primer aspecto de la invención para mejorar del rendimiento físico, deportivo y/o sexual.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende:

a) un primer recipiente con un hidrolizado de caseína láctea según se ha definido en el primer aspecto de la invención,

b) un segundo recipiente con un extracto de *Ginkgo biloba*, y

c) opcionalmente un tercer recipiente con un hidrolizado de proteína de suero lácteo según se ha definido en el primer aspecto de la invención.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere un método para preparar la composición del primer aspecto de la invención.

Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud serán evidentes para el experto en la materia a partir de la descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1.- Cromatograma obtenido tras el análisis por RP-HPLC-MS/MS del hidrolizado de caseína sometido a un proceso de precipitación selectiva de los caseinfosfopéptidos.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en la presente solicitud, las formas en singular “un/uno”, “una” y “el/la" incluyen sus correspondientes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos usados en el presente documento tienen el significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente.

La presente invención se refiere en un primer aspecto a una composición (referida de aquí en adelante como composición de la invención) que comprende:

a) un hidrolizado de caseína de leche caracterizado porque aumenta la expresión y/o actividad de eNOS *in vivo,* y/o aumenta los niveles de arginina en plasma *in vivo,* y/o tiene actividad antioxidante (referido de aquí en adelante como HC o hidrolizado HC);

b) un extracto de *Ginkgo biloba* (referido de aquí en adelante como GB o extracto GB); y opcionalmente

c) un hidrolizado de proteínas de suero lácteo de leche caracterizado porque tiene actividad inhibidora del enzima DDP-IV *in vitro* y/o tiene actividad antioxidante (referido de aquí en adelante como HPS o hidrolizado HPS).

Tal y como se ve en los Ejemplos 10 y 11, la composición HC+GB es efectiva en el tratamiento de trastornos relacionados con la disfunción endotelial, como por ejemplo la DE y la DSF. Así, en una realización particular la composición de la invención comprende a) y b). Ahora bien, la composición HC+HPS+GB es más efectiva aún en dicho tratamiento. Así, en una realización preferida, la composición del primer aspecto de la invención comprende a), b) y c).

El hidrolizado de caseína láctea aumenta la expresión de eNOS *in vivo*, tal y como se muestra en el Ejemplo 5. Esto, a la vista de los efectos vistos en los ensayos en humanos (Ejemplos 10 y 11), corrobora un aumento de la actividad eNOS *in vivo* y la formación de cGMP. Así, en una realización particular, el HC está caracterizado porque aumenta la expresión y/o la actividad de eNOS *in vivo*.

Asimismo, el HC aumenta el nivel de arginina en plasma *in vivo*, tal y como se muestra en el Ejemplo 6. Así, en una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el HC está caracterizado porque aumenta los niveles de arginina en plasma *in vivo*.

Además, tal y como se muestra en el Ejemplo 9, el HC y el HPS tienen actividad

antioxidante. Así, en una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el HC está caracterizado porque tiene actividad antioxidante, preferentemente actividad antioxidante *in vitro* y/o *in vivo*. En otra realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el HPS está caracterizado porque tiene actividad antioxidante, preferentemente actividad antioxidante *in vitro* y/o *in vivo*.

En una realización preferente según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el HC está caracterizado porque aumenta la expresión y/o actividad de eNOS *in vivo,* y aumenta los niveles de arginina en plasma *in vivo*, y tiene actividad antioxidante. De esta manera, sin querer estar atado por ninguna teoría, el HC y la composición de la presente invención pueden proporcionar a la vez el enzima y el sustrato necesarios para la síntesis de NO, y correlativamente la formación de cGMP facilitada por la actividad antioxidante. De hecho, es esperable que los niveles de NO y correlativamente cGMP en plasma aumenten debido a la mejora en la DE mostrada en los Ejemplos 10 y 11. A la vista del efecto sinérgico en cuanto a la actividad antioxidante (ver Ejemplo 9), en una realización más preferentemente, el HPS está caracterizado porque tiene actividad inhibidora del enzima DDP-IV *in vitro* y tiene actividad antioxidante.

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la composición de la invención no comprende como ingrediente adicional el aminoácido L-arginina aislado. Esto supone una importante ventaja ya que, incluso sin arginina adicional, se consigue tratar eficientemente la DE y la DSF (Ejemplos 10 y 11), evitando los problemas descritos para las composiciones orales que comprenden arginina (Salvatore *et al*, Acta Biomed 2014, vol. 85, nº 3: 222-228).

En una realización particular de la composición de la invención según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el HC comprende al menos un caseinfosfopéptido (CPP). En el contexto de la presente invención, los CPPs se refieren a péptidos que comprende entre 7 y 25 aminoácidos con distinto grado de fosforilacion.

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el HC comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó 21 CPPs seleccionados del grupo formado por las secuencias SEC ID Nº 1 a SEC ID Nº 21. Preferentemente, la composición de la invención comprende todos (21) los CPPs de secuencias SEC ID Nº 1 a SEC ID Nº 21.

En una realización particular, los CPPs están unidos a al menos un mineral. Los HC que comprenden dichos CPPs se refieren en la presente invención como HC enriquecidos en minerales, HC coadyuvado con minerales, o HC conjugado con minerales, y se denotan con HC-M, siendo M el mineral. Así, por ejemplo, el HC enriquecido en potasio se denota HC-K. En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, el mineral se selecciona del grupo formado por zinc, magnesio, hierro, potasio, calcio y combinaciones de los mismos, más particularmente el mineral es zinc, magnesio, hierro y/o calcio. Preferentemente, el mineral es zinc que, como se ve en el Ejemplo 10, supone una mejoría en el tratamiento de la DE.

Ventajosamente, como se muestra en los Ejemplos 2 y 3, los CPPs de la presente invención son resistentes a la digestión gastrointestinal simulada *in vitro*, son capaces de transportar minerales durante dicha digestión. Además, estos CCPs proporcionan grupos fosfato al plasma aumentando la capacidad de fosforilación y con ella de activación de eNOS.

Los autores de la presente invención, han visto que el uso del hidrolizado HC completo (sin separación de fracciones) tiene un efecto mejorado, entre otros , en cuanto al aumento de la expresión de eNOS, frente al uso de cada una de las fracciones por separado (menor y mayor de 3.000 Da) o incluso frente al efecto de la suma de ambas fracciones. Además, así se mantienen los CPPs en el HC con las ventajas que ello conlleva. Así, en una realización preferente según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el hidrolizado HC es un hidrolizado completo, i.e. no es una fracción aislada/purificada, ni es una combinación de fracciones aisladas/purificadas.

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el hidrolizado HC comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis péptidos seleccionados del grupo formado por los péptidos de secuencia (péptido consiste en la secuencia) YFY, YLG, YLGY (SEC ID Nº 22), RYLG (SEC ID Nº 23), YFYPE (SEC ID Nº 24), YFYPEL (SEC ID Nº 25). Estos péptidos, cuando el HC se separa en fracciones mayor y menor de 3.000 Da, se encuentran en la fracción menor de 3.000 Da. Estos péptidos, como se muestra en el Ejemplo 7, tienen actividad inhibidora del enzima convertidora de angiotensina (IECA) *in vitro.* Además, los autores de la invención han visto que tienen actividad antihipertensiva *in vivo*. En una realización particular de la composición de la invención, el HC comprende uno, dos o tres péptidos seleccionados del grupo formado por los péptidos de secuencia YFY, YFYPE y YFYPEL. Más particularmente, comprende uno o dos péptidos YFYPE y YFYPEL. Ventajosamente, todos estos péptidos son resistentes a la digestión gastrointestinal. En una

realización preferida, el HC comprende el péptido de secuencia YFY y/o YLG, que son de menor tamaño y por tanto, además de ser resistentes a la digestión, son más fácilmente absorbibles en el tracto gastrointestinal.

En la presente invención, la caseína láctea puede ser cualquier caseína. En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la caseína comprende al menos una caseína seleccionada del grupo formado por α_{s1}-caseína, α_{s2}-caseína, β-caseína, κ-caseína y mezclas de los mismos. Preferentemente, la caseína comprende α_{s1}-caseína, α_{s2}-caseína, β-caseína y κ-caseína, teniendo así todos los CPPs de la Tabla 1.

En otra realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el hidrolizado HC es obtenible por digestión simple (sin digestiones adicionales) con un enzima gástrico, preferentemente pepsina, o por digestión doble secuencial (sin digestiones adicionales), primero con un enzima gástrico, preferentemente pepsina, y después con un enzima intestinal, preferentemente tripsina. Más particularmente, es obtenible por los métodos para preparar HC descritos en el quinto aspecto de la invención.

El hidrolizado de suero lácteo tiene actividad inhibidora del enzima DDP-IV *in vitro*, tal y como se muestra en el Ejemplo 8.

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el hidrolizado HPS comprende uno, dos, tres, cuatro o cinco péptidos seleccionados del grupo formado por los péptidos de secuencia DAQSAPLR (SEC ID Nº 26), HTSGYDTQ (SEC ID Nº 27), EQLTQ (SEC ID Nº 28), KIPAVF (SEC ID Nº 29) e IPAVF (SEC ID Nº 30). Preferentemente, el hidrolizado HPS comprende el/los péptidos SEC ID Nº 26 y/o SEC ID Nº 27 y/o SEC ID Nº 30, que son resistentes a la digestión gastrointestinal, y más preferiblemente HPS comprende uno o dos péptidos seleccionados de SEC ID Nº 27 y SEC ID Nº 30 que tienen mejor actividad inhibidora del enzima DDP-IV *in vitro* (ver Ejemplo 8).

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el hidrolizado HPS es obtenible por digestión simple con tripsina (sin digestiones adicionales). Más particularmente, es obtenible por el método para preparar HPS descrito en el quinto aspecto de la invención.

La proteína de suero lácteo puede ser cualquier preparado lácteo de proteínas de suero que comprenda beta-lactoglobulina y alfa-lactoalbúmina, preferentemente en sus proporciones

naturales. En una realización preferente la proteína de suero lácteo es un concentrado de proteínas de suero de leche (WPC del inglés *whey protein concentrate*). Más preferentemente es un WPC que contenga mas del 90% de las proteínas nativas del suero, incluyendo tanto beta-lactoglobulina como alfa-lactoalbúmina, en sus proporciones originales.

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la caseína láctea y la proteína de suero lácteo provienen de leche de vaca, búfala, oveja, cabra, yegua, camella, alce, cerda y combinaciones de las mismas, preferentemente provienen de leche de vaca.

Sorprendentemente, la combinación de HC y HPS tiene, frente a los hidrolizados por separado, un efecto mejorado, e incluso sinérgico, en cuanto la actividad antioxidante (ver Ejemplo 9). Esto supone una importante ventaja, ya que, sin querer estar atado por la teoría, puede ayudar a proteger al NO, producido por la eNOS aumentada por HC, de la oxidación, favoreciendo así los efectos producidos por NO, en particular la formación de cGMP. Así, como se ha indicado anteriormente, en una realización preferente de la invención según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la composición de la presente invención comprende HC, GB y HPS.

Como se ha indicado anteriormente, la composición de la invención comprende un extracto de *Ginkgo biloba,* en concreto un extracto seco de GB. Se puede usar la planta entera o alguna de sus partes, por ejemplo, raíz y/u hojas, preferentemente la hoja. En una realización preferente, el extracto de GB comprende un mínimo de 18% de glucósidos de flavonol, y un mínimo de 4% de lactonas terpénicas. Preferentemente el extracto de GB comprende 22%-27% de flavonoides expresados como glucósidos flavónicos y 5-7% de lactonas terpénicas. Más preferentemente el extracto GB es extracto estandarizado seco de GB que es el usado en los Ejemplos.

Ventajosamente, la combinación del extracto de GB con HC o con HC+HPS resulta en una mejora en el tratamiento eficaz de una condición o trastorno relacionado con la función endotelial, como son, por ejemplo, la DE y DSF (ver Ejemplos 10 y 11). Tal y como se ve en los Ejemplos, la composición HC+GB es efectiva en el tratamiento de dichos trastornos, y la composición HC+HPS+GB es más efectiva aún, así en una realización preferente según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la composición de la invención comprende HC, HPS y GB. Igualmente, los inventores han visto que la administración de las composiciones

de la invención (HC+GB y HC+HPS+GB), mejoran también el rendimiento físico, deportivo y sexual en sujetos sanos. Estos sujetos no padecen ningún trastorno relacionado con la disfunción endotelial y se benefician de la mejora de la función endotelial que se consigue con las composicones de la presente invención. Sorprendentemente, estas mejoras, tanto en sujetos con disfunción endotelial como en sujetos sanos, son sinérgicas, pues son superiores al efecto aditivo de los componentes de la composición por separado.

En una realización particular de la invención según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la composición comprende:

- 45% - 95% de HC, preferentemente 65-95%;
- 1% - 9% de GB, preferentemente 1-6%; y
- Opcionalmente HPS, preferentemente 0-30% de HPS.

Preferentemente la composición comprende 3-30% de HPS, más preferiblemente 3-15% de HPS.

Más particularmente, la composición según una de las realizaciones anteriores comprende además un mineral, en cuyo caso el contenido del mineral es de 0,2% - 20%, dependiendo de las recomendaciones de los organismos relacionados con la salud para consumo diario en cada mineral, preferiblemente 0,2%-10%, y más preferiblemente 0,2-3%. El mineral se selecciona del grupo formado por zinc, magnesio, hierro, potasio, calcio y combinaciones de los mismos, más particularmente el mineral es zinc, magnesio, hierro y/o calcio. Preferentemente, el mineral es zinc.

En una realización particuar la composición de la invención comprende 45% - 95% de HC y 1% - 9% de GB, preferentemente comprende 65-95% de HC y 1-6% de GB. Preferentemente, cualquiera de estas composiciones comprende 0-30% de HPS, más preferentemente 3-30% de HPS, y más preferiblemente aún 3-15% de HPS.

En el contexto de la presente invención, los porcentajes están dados en peso respecto al peso total de la composición, a no ser que se indique lo contrario.

En una realización preferente, la composición de la invención consiste en:

- 45% - 95% de HC, preferentemente 65-95%;
- 1% - 9% de GB, preferentemente 1-6%,
- 0% - 30% de HPS, preferentemente 3-30% y más preferiblemente 3-15%; y

- opcionalmente 0,2% - 20% un mineral, preferiblemente 0,2-10%, y más preferiblemente 0,2-3%,

de manera que la suma total sea 100%.

El mineral puede ser uno o varios minerales. Las realizaciones particulares y preferentes definidas para HC, HPS, GB y el mineral a lo largo del primer aspecto de la invención son aplicables a la realización preferente del párrafo anterior.

En una realización particular de la composición de la invención según una cualquiera de las realizaciones anteriores en las que la composición de la invención comprende HC y HPS, la proporción HC:HPS es de 2:1 a 15:1, preferentemente de 7:1 a 12:1 y más preferentemente 10:1. La composición así obtenida tiene, por ejemplo, una actividad antioxidante mejorada, teniendo en cuenta la menor dosis de HPS (ver Ejemplo 9).

El primer aspecto de la invención también se refiere a los hidrolizados comprendidos en la composición de la presente invención según una cualquiera de las realizaciones definidas dadas en el primer aspecto de la invención. Así, se refiere a un hidrolizado de caseína tal y como se ha definido en cualquiera de las realizaciones de la composición de la invención según el primer aspecto de la invención. También se refiere a un hidrolizado de proteínas de suero tal y como se ha definido en cualquiera de las realizaciones de la composición de la invención según el primer aspecto de la invención. Se refiere también a una composición que comprende estos hidrolizados HC y HPS (sin GB), preferentemente en una proporción HC:HPS de 2:1 a 15:1, más preferentemente de 7:1 a 12:1, y más preferentemente aún de 10:1. En una realización particular de la composición que comprende HC y HPS, el HC aumenta la expresión y/o actividad de eNOS *in vivo* y aumenta los niveles de arginina en plasma *in vivo* y tiene actividad antioxidante y el HPS tiene actividad inhibidora del enzima DDP-IV *in vitro* y tiene actividad antioxidante. Esta composición, como se ha indicado anteriormente, tiene un efecto antioxidante mejorado. Así, la invención también se refiere a su uso como agente antioxidante.

En vista a los componentes de la composición de la invención la composición de la presente invención se puede considerar una composición de naturaleza o carácter alimentario (e.g. por el origen de los componentes, por el método de preparación). Así, en una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la composición de la invención es una composición de naturaleza alimentaria. Más particularmente, la composición no comprende ninguna molecula de síntesis o principios activos farmacéuticos

adicionales; y preferentemente HC, GB y opcionalmente HPS y el mineral son los únicos principios activos de la composición, y más preferentemente, estando el HC sin fraccionar y el HPS sin fraccionar.

En una realización particular, la composición de la invención no comprende otras plantas o partes o semillas de las mismas y/o no comprende extractos de dichas plantas o partes o semillas de las mismas. Así, por ejemplo, la composición de la invención no comprende ginseng (*Panax ginseng*), o maca (*Lepidium meyeneii*), o cebollino, o guaraná, o jengibre, o combinaciones de las mismas, ni partes o semillas de ellas.

El que la composición sea de naturaleza o carácter alimentaria tiene importantes ventajas especialmente en lo relativo a la toxicidad y efectos secundarios asociados a las composiciones farmacéuticas. En el presente caso, de hecho, la composición de la presente invención no es tóxica y carece prácticamente de efectos secundarios. Además, puede ser considerada como un complemento alimenticio.

La composición de la invención según el primer aspecto de la invención es preferiblemente una composición oral. Así, puede estar en forma de comprimido, cápsula o jarabe, por ejemplo.

La composición de la presente invención y sus componentes pueden incorporarse en productos alimenticios, suplementos alimenticios, bebidas y en la elaboración de productos farmacéuticos. Así, en un segundo aspecto, la invención se refiere a un medicamento, un suplemento o complemento alimenticio, una bebida o un producto alimenticio que comprende un hidrolizado y/o una composición según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención. Preferentemente, se refiere a un medicamento, un suplemento alimenticio, una bebida o un producto alimenticio que comprende la composición de la invención según una cualquier de las realizaciones descritas en el primer aspecto de la invención.

El suplemento o complemento alimenticio se refiere a cualquier componente alimenticio que proporciona componentes nutritivos o medicinales específicos y no proporciona el valor energético completo requerido (es decir, generalmente menos que 2.000 o 2.500 kcal/día) e incluye suplementos alimenticios en forma de polvo o comprimidos, al igual que productos dietéticos, tales como bebidas dietéticas. También están incluidos ingredientes que se pueden añadir al alimento antes de su consumo o una preparación que puede ser

consumida como tal.

La composición de la invención, o los medicamentos, suplementos alimenticios, bebidas o productos alimenticios que la comprenden, sirven para mejorar la función endotelial vascular. Así, sirven para tratar un trastorno o condición relacionado con la disfunción endotelial (e.g. trastorno o condición que cursa con y/o es causada por disfución endotelial).

Asimismo, sirven para mejorar aquellas condiciones que dependen de una buena función endotelial o incluso mejoran cuando mejora la función endotelial, como puede ser el rendimiento físico, deportivo y/o sexual de un sujeto, en particular de un sujeto que no tiene ningún trastorno o condición relacionado con la disfunción endotelial y más particularmente en un sujeto sano.

Así, en un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de una composición según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, para la preparación de un medicamento, un suplemento alimenticio, una bebida o un producto alimenticio para el tratamiento de un trastorno relacionado con la disfunción endotelial.

El tercer aspecto de la invención se refiere también a una composición según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con la disfunción endotelial.

Además, se refiere a un método de tratamiento de un trastorno relacionado con la disfunción endotelial en un sujeto (mamífero, preferentemente humano), que comprende la administración, preferentemente de una cantidad terapéuticamente efectiva, a dicho sujeto de una composición según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención o de un medicamento, suplemento alimenticio, bebida o producto alimenticio según el segundo aspecto de la invención. En una realización preferente, la administración se lleva a cabo por vía oral.

En una realización particular según uno cualquiera de los tres párrafos anteriores del tercer aspecto de la presente invención, el trastorno relacionado con la disfunción endotelial se selecciona del grupo formado por disfunción sexual (por ejemplo, disfunción eréctil, disfunción sexual femenina), degeneración macular, rinitis crónica, púrpura de Schamberg, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, hipertensión, hipercolesterolemia, hiperglucemia, ictus, apoplejía, infarto de miocardio, enfermedad vascular periférica, angina de pecho,

insuficiencia cardiaca, disfunción ventricular diastólica y/o sistólica, macro y microangiopatía en pacientes con diabetes, lesión tisular relacionada con isquemia y reperfusión, enfermedades neurodegenerativas (e.g. Alzheimer) y combinaciones de las mismas. Preferentemente, el trastorno relacionado con la disfunción endotelial es disfunción sexual (por ejemplo, disfunción eréctil, disfunción sexual femenina), degeneración macular, rinitis crónica o púrpura de Schamberg, y más preferentemente es disfunción sexual (por ejemplo, disfunción eréctil o disfunción sexual femenina).

El término "disfunción sexual" generalmente incluye cualquier disfunción sexual en un paciente, incluyendo un animal, preferiblemente un mamífero, preferiblemente un humano. El paciente puede ser hombre o mujer. Las disfunciones sexuales pueden incluir, por ejemplo, trastornos del deseo sexual, trastornos de excitación sexual, trastornos orgásmicos, trastornos del dolor durante el sexo y combinaciones de las mismas. La disfunción sexual femenina se refiere a cualquier disfunción sexual femenina, incluyendo, por ejemplo, trastornos del deseo, disfunciones de la excitación sexual, disfunciones orgásmicas, trastornos del dolor durante el sexo, dispareunia, vaginismo y combinaciones de los mismos. La mujer puede ser premenopáusica o menopáusica. La disfunción sexual masculina se refiere a cualquier disfunción sexual masculina, incluyendo, por ejemplo, disfunción eréctil e impotencia.

El tercer aspecto de la invención se refiere también a una composición según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, para su uso como coadyuvante en el tratamiento de un trastorno relacionado con la disfunción endotelial vascular. Particularmente dicho trastorno se selecciona del grupo formado por aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, hipertensión, hipercolesterolemia, hiperglucemia, ictus, apoplejía, infarto de miocardio, enfermedad vascular periférica, angina de pecho, insuficiencia cardiaca, disfunción ventricular diastólica y/o sistólica, macro y microangiopatía en pacientes con diabetes, lesión tisular relacionada con isquemia y reperfusión, enfermedades neurodegenerativas (e.g. Alzheimer), disfunción sexual, degeneración macular, rinitis crónica, púrpura de Schamberg, y combinaciones de las mismas. Preferentemente, degeneración macular, rinitis crónica o púrpura de Schamberg.

Igualmente, el tercer aspecto se refiere a un método de tratamiento de un transtorno relacionado con la disfunción endotelial en el que la composición de la invención se administra como adyuvante a un sujeto. También se refiere al uso de la composición de la invención para preparar un coadyunvante para el tratamiento de un transtorno relacionado

con la disfunción endotelial, y en particular de un trastorno según se ha definido en el párrafo.

El tercer aspecto de la invención se refiere también al uso de una composición según una cualquiera de las realizaciones descritas en el primer aspecto de la invención, para mejorar cualquier condición que mejore al mejorar la función endotelial, por ejemplo, el rendimiento físico, deportivo y/o sexual. También se refiere al uso de dichas composiciones para la preparación de un suplemento alimenticio, bebida o producto alimenticio para mejorar el rendimiento físico, deportivo y/o sexual. Igualmente, se refiere a un método para mejorar el rendimiento físico, deportivo y/o sexual, que comprende la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de una composición según una cualquiera de las realizaciones descritas en el primer aspecto de la invención y/o de un suplemento alimenticio, bebida o producto alimenticio según una cualquiera de las realizaciones descritas en el segundo aspecto de la invención.

Los términos rendimiento físico, deportivo y sexual son ampliamente conocidos por el experto en la materia.

En una realización particular, la mejora en el rendimiento deportivo incluye al menos uno de los siguientes aspectos: mejorar el rendimiento de la fuerza, cambiar las respuestas fisiológicas a los ejercicios de resistencia, aumentar el volumen de sangre de los músculos durante la recuperación del ejercicio de resistencia, mejora de la perfusión sanguínea muscular, aumento del trabajo total, aumento de la resistencia a la fatiga.

Sin estar atado por la teoría, la capacidad antioxidante mejorada de la composición de la invención (ver Ejemplo 9) es importante para cualquier función endotelial relacionada y/o dependiente del NO, y es especialmente importante en cuanto al uso de la composición para mejorar el rendimiento físico, deportivo y/o sexual ya que el NO es una molécula que reacciona rápidamente con especies de oxígeno reactivas, cuyo nivel aumenta después del ejercicio. Así, en una realización preferente según una cualquiera de las realizaciones del tercer aspecto de la invención, la composición comprende HC, GB y HPS. Esta realización preferente también es ventajosa porque los autores de la presente invención han visto que hay un efecto sinérgico en cuanto al aumento de expresión y/o actividad de eNOS *in vivo* al combinar HC con HPS (datos no mostrados), favoreciendo así la producción de NO y correlativamente cGMP.

Las realizaciones particulares y preferentes descritas en el primer aspecto de la invención en relación a la composición, los hidrolizados y al GB, son aplicables al tercer aspecto de la invención.

El uso de la composición de la presente invención, supone una gran ventaja frente a los tratamientos y suplementos químicos ya que los hidrolizados enzimáticos de proteínas alimentarias y el extracto de GB son ingredientes alimenticios de origen natural que carecen de toxicidad o tienen una toxicidad mínima.

Para uso en un medicamento o suplemento alimenticio, la composición de la invención, o sus componentes, según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, se puede combinar con cualquier portador, diluyente, adyuvante, excipiente, etc. adecuado, para obtener el medicamento o suplemento en la forma de administración deseada. Así, pueden presentarse en cualquier forma de administración, sólido ó líquido, y administrarse por cualquier vía apropiada, oral, respiratoria, rectal o tópica. Ventajosamente, dicha composición, medicamento o suplemento alimenticio se administra por vía oral. Ejemplos de dichas formulaciones, que pueden ser preparadas usando métodos y excipientes bien conocidos, tales como los descritos en, *"Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook"* Mack Pub. Co., N.Y. U.S.A., son comprimidos, cápsulas, jarabes y similares para administración oral, mientras que para administración parental las formas adecuadas son soluciones estériles o suspensiones en líquidos aceptables, implantes, etc. Ejemplos preferidos de excipientes son celulosa microcristalina, goma xantana, estearato de magnesio, dióxido de silicio y combinaciones de los mismos.

Para uso en una bebida o producto alimenticio, la composición de la invención, o sus componentes, según el primer aspecto de la invención se puede combinar con cualquier ingrediente alimenticio común. El término "bebida" pretende incluir líquidos y jarabes, al igual que formulaciones en polvo para ser disueltas en agua u otro componente líquido para la preparación de bebidas instantáneas.

La posología dependerá de varios factores tales como peso del sujeto, sexo, tipo y gravedad de las condiciones a ser tratadas, etc. y será fácilmente determinada por el profesional experto. Preferiblemente, la composición de la invención se administra a un nivel de entre 1 mg y 60 mg por día y por kg del sujeto al que se le administran. Preferentemente, se administran al menos 300 mg de composición al día. La dosis máxima puede estar determinada por el máximo admitido por la legislación que aplique en cada país. Así, por

ejemplo, en Europa, para el GB (considerado *novel food*), dicha dosis máxima se refiere actualmente a un máximo diario de 21,6 mg de glucósidos de flavonol y 5,4 mg de lactonas terpénicas.

Los componentes de la composición de la invención, HC, GB y opcionalmente HPS pueden proporcionarse por separado para su uso combinado. Así, la presente invención en un cuarto aspecto se refiere a un kit de partes que comprende:

a) un primer recipiente con un hidrolizado de caseína según se ha definido en una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención;

b) un segundo recipiente con un extracto de *Ginkgo biloba*; y opcionalmente

c) un tercer recipiente con hidrolizado de proteína de suero láctico según se ha definido en una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención.

Una realización preferente del kit de la invención, comprende los tres recipientes a), b) y c), por las ventajas indicadas anteriormente para el uso de la composición con HC, GB y HPS.

Las realizaciones particulares y preferentes descritas en el primer aspecto de la invención en relación a los hidrolizados y al GB, son aplicables al kit del cuarto aspecto de la invención. En una realización particular, el kit comprende a) y c), y opcionalmente b).

El presente kit proporciona los ingredientes que en combinación sirven para el tratamiento de un trastorno relacionado con la disfunción endotelial, como adyuvante de dicho trastorno, y para mejorar el rendimiento físico, deportivo y/o sexual, tal y como se ha indicado anteriormente para la composición y medicamente, suplemento, etc. que la comprenden (ver tercer aspecto de la invención). Así, en una realización particular la invención se refiere a dicho kit para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con la disfunción endotelial y al uso de dicho kit para mejorar cualquier condición que mejore al mejorar la función endotelial, por ejemplo, el rendimiento físico, deportivo y/o sexual. Al proporcionarse los hidrolizados y el GB por separado, el usuario puede preparar la composición que le interese según sus necesidades. En una realización particular, el kit comprende también instrucciones de uso. Las realizaciones particulares y preferidas del trastorno relacionado con la disfunción endotelial y del rendimiento físico, deportivo y sexual definidas en el tercer aspecto de la invención son aplicables al cuarto aspecto de la invención.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a los métodos para preparar los hidrolizados HC y HPS, y la composición de la invención.

Los hidrolizados se obtienen disolviendo o dispersando el material de partida (suero o caseína) a una concentración adecuada en agua o en una solución tampón que se encuentra a un pH óptimo para la actividad de las enzimas gástricas e intestinales (pepsina y/o tripsina, o cualquier otra de funciones similares). Las condiciones de hidrólisis pH, temperatura, tipo de sustrato, relación enzima sustrato, tiempo de hidrólisis, orden de adición de las enzimas e inactivación de la/s enzima/s son tales que permiten seleccionar los hidrolizados con la acción terapéutica de interés.

Así, el quinto aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar un hidrolizado de caseína según se define en el primer aspecto de la invención (referido de aquí en adelante como método HC-1), que comprende las siguientes etapas:

a) Proporcionar un sustrato lácteo apropiado, preferentemente caseína;

b) Disolver o suspender dicho sustrato en agua o en una disolución tampón, a un pH adecuado para la acción proteolítica del enzima gástrica, preferentemente pepsina, en condiciones gástricas, preferiblemente a pH de entre 2 y 4 y a temperatura de entre 37ºC y 40ºC;

c) Añadir el enzima gástrico, en una relación enzima/sustrato de entre 1/100 y 10/100 (p/p);

d) Mantener la reacción durante un tiempo de entre 6 y 28 horas, preferiblemente 25-28 horas, y en dicho tiempo añadir entre 1-10% de enzima, preferentemente la misma cantidad de enzima que en la etapa c), en intervalos crecientes de entre 4 y 8 horas;

e) inactivar el enzima, preferentemente subiendo el pH a 7-9;

f) Opcionalmente, añadir un compuesto soluble en agua que contiene un mineral e incubar, preferentemente a entre 37ºC y 40ºC y/o durante entre 0,5 y 1 horas;

g) Desecar.

El método HC-1 resulta en un HC que junto con GB, y opcionalmente HPS, es efectivo en la mejora de la función endotelial y sirve por tanto para los tratamientos y mejoras descritas en el tercer aspecto de la invención. Ventajosamente, los autores de la presente invención han optimizado más aún dicho método de manera que se consigue un tratamiento y mejora más eficiente aún que con el hidrolizado obtenible con HC-1. Dicho método optimizado comprende además una digestión en condiciones intestinales después de la digestión gástrica de HC-1. Dicho método (referido de aquí en adelante como método HC-2), comprende las etapas a)-e) como se han definido anteriormente para HC-1 y a continuación las siguientes etapas:

f) Establecer una temperatura de entre 37ºC y 40ºC y un pH de condiciones intestinales (si no se ha puesto a este pH en la etapa anterior), preferiblemente pH 7-9, añadir enzima

intestinal, preferentemente tripsina, en una relación enzima/sustrato de entre 1/100 y 10/100 (p/p), e incubar durante un tiempo de entre 2 y 6 horas, preferentemente 3-5 horas;

g) Opcionalmente, añadir un compuesto soluble en agua que contiene un mineral e incubar, preferiblemente a entre 37ºC y 40ºC, más preferentemente a la misma temperatura y pH que en la etapa anterior, y/o durante entre 0,5 y 1 horas;

h) Inactivar el enzima intestinal; y

i) desecar.

Es decir, el método HC-2 comprende las mismas etapas que el método HC-1, correspondiendo las etapas g) e i) de HC-2 con las etapas f) y g) de HC-1, respectivamente, y adicionalmente comprende las etapas f) y h) en el orden arriba indicado.

Cuando se lleva a cabo la etapa e) en HC-1 o g) en HC-2, el HC es un HC enriquecido con un mineral (HC-M), es decir, el HC comprende al menos un CPPs unido a un mineral. En una realización particular, el mineral se selecciona de magnesio, hierro, potasio, zinc, calcio y combinaciones de los mismos, preferentemente es magnesio, hierro, calcio y/o zinc, y más preferiblemente el mineral es zinc.

El quinto aspecto de la presente invención se refiere también a un método para preparar el hidrolizado de proteína de suero según una cualquier de las realizaciones definidas en el primer aspecto de la invención (referido de aquí en adelante como método HPS), que comprende las siguientes etapas:

a) Proporcionar un sustrato lácteo apropiado, preferentemente proteína de suero lácteo;

b) Disolver o suspender dicho sustrato en agua o en una disolución tampón, a un pH adecuado para la acción proteolítica de un enzima intestinal, preferentemente tripsina, en condiciones intestinales, preferentemente a un pH entre 7 y 9, y a una temperatura de entre 37ºC y 40ºC;

c) Añadir enzima intestinal, preferiblemente tripsina, en una relación enzima/sustrato de entre 1/100 y 10/100 (p/p);

d) Mantener la reacción durante un tiempo de entre 6 y 24 horas, preferiblemente entre 8 y 14 horas;

e) Inactivar el enzima intestinal; y

f) Desecar.

En una realización particular de cualquiera de los métodos anteriores los ajustes de pH se hacen con HCl o KOH, según corresponda. En otra realización, la inactivación de la tripsina

se lleva a cabo mediante calor o ajustando el pH, preferiblemente hasta un pH comprendido entre 3 y 5. En otra realización particular, el desecado se lleva a cabo por liofilización o por calor en estufa, horno o atomizador.

Igualmente, el quinto aspecto de la invención se refiere a un método para preparar la composición de la invención según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, que comprende las siguientes etapas:
i) llevar a cabo el método HC-1 o HC-2, y opcionalmente el método HPS; y
ii) mezclar en la cantidad deseada de HC, y opcionalmente HPS, obtenido(s) en la etapa i) y el extracto de *Ginkgo biloba.*

En una realización particular, en la etapa i) el método es el método HC-M descrito anteriormente.

Las realizaciones particulares y preferentes definidas en el primer aspecto de la invención, en particular en cuanto a las cantidades, proporciones y los componentes de la composición de la invención son aplicables a los métodos del quinto aspecto de la invención.

El quinto aspecto de la presente invención, se refiere también a los hidrolizados HC, HPS, y composiciones obtenibles por cualquiera de los métodos descritos en los párrafos anteriores del quinto aspecto de la invención en cualquiera de sus realizaciones particulares. Además, se refiere a composiciones que comprenden HC y HPS obtenibles por los métodos HC (HC-1 o HC-2) y el método HPS, respectivamente. Además, se refiere a medicamentos, suplementos alimenticios, bebidas, productos alimenticios o kits que los comprenden y a su uso, tal y como se ha definido en el segundo, tercer y cuarto aspecto de la invención.

Ejemplos

A continuación se detallan unos ejemplos concretos de realización de la invención que sirven para ilustrar la invención.

EJEMPLO 1.- Hidrolizado de caseína

1.1.- Obtención del hidrolizado de caseína

El hidrolizado de caseína (HC) se obtuvo utilizando como sustrato caseína bovina que se

dispersó en agua al 2% (p/v) y luego se ajustó el pH a entre 2 y 4 con HCl y se mantuvo la temperatura entre 37 y 40ºC durante todo el proceso. A continuación se adicionó el enzima gástrico, en este caso particular, pepsina porcina en una relación enzima/sustrato de entre 1/100 y 10/100 (p/p). Para compensar la degradación de la pepsina se volvió a añadir la misma cantidad de enzima que antes a las 4, 10 y 17 horas del comienzo. A las 25 horas se paró la reacción inactivando el enzima mediante subida del pH a pH 8 adicionando KOH. A continuación se realizó una segunda hidrólisis utilizando como sustrato el producto de la primera hidrólisis al que se añadió el enzima intestinal, en este caso particular la tripsina, en una relación enzima/sustrato de entre 1/100 y 10/100 (p/p) e incubando a la misma temperatura de 40ºC durante 2 h. El enzima se inactivó disminuyendo el pH a entre 3-5. Posteriormente el hidrolizado se secó en una estufa a 90ºC.

1.2.- Obtención del HC enriquecido con moléculas de mineral conjugadas a CPPs

Se siguió el proceso anterior pero añadiendo el mineral de interés al terminar las 2 h de hidrólisis con tripsina y se mantuvo a 40ºC y pH 8 durante una hora antes de bajar el pH a 4,5. Cada uno de los minerales de interés se añadió de la siguiente manera:
Potasio: KCl en proporción (peso seco) HC: KCl de 3:1;
Magnesio: MgO en proporción (peso seco) HC: MgO de 5:1;
Hierro: $C_4H_8FeN_2O_4$ en proporción (peso seco) HC:$C_4H_8FeN_2O_4$ de 5:1;
Zinc: $ZnSO_4$ en proporción (peso seco) HC:$ZnSO_4$ de 90:1;
Calcio: $Ca_3(PO_4)_2$ en proporción (peso seco) HC: $Ca_3(PO_4)_2$ de 5:1.

Los HC, HC-K, HC-Zn, HC-Ca, HC-Mg, HC-Fe citados en los siguientes ejemplos se produjeron siguiente los métodos descritos en esta sección, según corresponda. No se realizó ninguna separación de fracciones del hidrolizado, i.e. se usó un hidrolizado completo.

EJEMPLO 2.- Determinación de la capacidad de resistencia a la digestión de los CPPs generados en el hidrolizado de caseína

Terminada la hidrolisis con tripsina del Ejemplo 1.1 se observó que el hidrolizado obtenido conservaba un 78% del contenido en fósforo de la caseína de partida, lo que indica la presencia de las regiones fosforiladas de las caseínas. La identificación de estos péptidos fosforilados se realizó por HPLC-Ms/MS y se describe en la figura 1 y tabla 1. De las 55 secuencias peptídicas que se identificaron (figura 1), 21 fragmentos correspondieron a CPPs, seis de ellos procedentes de la αs1-caseína, ocho de la αs2-caseína, seis derivados

de la β -caseína y uno de la κ-caseína. Debe destacarse que cuatro CPPs contenían la secuencia SpSpSpEE, específicamente los péptidos αs1-caseína (61-74)4P, αs2-caseína (51-64)3P, β-caseína (1-25)4P y β-caseína (2-25)4P. De los 34 péptidos no fosforilados encontrados, nueve derivaban de la αs1-caseína, siete de la αs2-caseína, 16 de la β-caseína, y dos de la κ-caseína. La mayoría de estos péptidos no fosforilados contenían residuos cargados negativamente. Algunos péptidos no corresponden a los que se formarían teniendo en cuenta la especificidad de la tripsina, por lo que pueden haberse formado por la acción de la pepsina utilizada durante la primera parte de la hidrólisis.

Tabla 1.- Péptidos identificados en el hidrolizado.

Compuesto[a]	***m/z* obs.**	***m/z* cal.**	**Fragmento**	**Secuencia (SEC ID Nº)**
2	1.103,5	1.103,40	β-CN(33-40)1P	FQSpEEQQQ (1)
4	1.240,5	1.240,36	α_{s1}-CN(43-52)2P	DIGSpESpTEDQ (2)
6	1.810,0	1.810,55	α_{s1}-CN(61-74)4P	EAESpISpSpSpEEIVPN (3)
8	1.577,7	1.577,64	α_{s2}-CN(133-145)1P	ENSKKTVDMESpTE (4)
16	1.351,7	1.351,70	α_{s2}-CN(119-129)1P	ITPTLNREQLSp (5)
18	1.223,5	1.223,69	α_{s1}-CN(110-119)1P	EIVPNSpAEER (6)
21	2.062,10	2.061,82	β-CN(33-48)1P	FQSpEEQQQTEDELQDK (7)
23	1.690,8	1.690,64	β-CN(33-45)1P	FQSpEEQQQTEDEL (8)
24	1.712,8	1.713,52	α_{s2}-CN(51-64)3P	EYSIGSpSpSpEESAEV (9)
25	1.437,8	1.437,57	α_{s2}-CN(122-132)2P	TLNREQLSpTSpE (10)
28	1.336,7	1.336,61	α_{s1}-CN(109-119)1P	LEIVPNSpAEER (11)
30	1.927,9	1.927,90	α_{s1}-CN(43-58)2P	DIGSpESpTEDQAMEDIK (12)
33	1.466,8	1.467,41	κ-CN(144-156)1P	ATLEDSpEVIESP (13)
39	1.660,9	1.660,79	α_{s1}-CN(106-119)1P	VPQLEIVPNSpAEER (14)
40	1.365,7	1.365,56	α_{s2}-CN(137-147)1P	KTVDMESpTEVF (15)
41	1.237,6	1.237,60	α_{s2}-CN(138-147)1P	TVDMESpTEVF (16)
44	1.952,1	1.951,95	α_{s1}-CN(104-119)1P	YKVPQLEIVPNSpAEER (17)
46	1.230,1	2.556,09	β-CN(33-52)1P	FQSpEEQQQTEDELQDKIHPF (18)
47	1.562,2	3.123,4	β-CN (1-25)4P	RELEELNVPGEIVESpLSpSpSpEESITR (19)
50	1.364,9	1.365,56	α_{s2}-CN(139-149)1P	VDMESpTEVFTK (20)
55	1.483,7	2.966,16	β-CN(2-25)4P	ELEELNVPGEIVESpLSpSpSpEESITR (21)

Sp, fosfoserina.

[a] Numeración según lo indicado en el cromatograma de la Figura 1.

Obs.: observada

Cal.: calculada

Se realizó una comparación de los CPPs resultantes después de la digestión con pepsina y tripsina, con la digestión gastrointestinal simulada *in vitro* usando el protocolo de Martos et al., 2010 (*Egg white ovoalbumin digestion mimicking physiological conditions*. J. Agric. Food Chem., 2010, 58, 5640-5648). Debe resaltarse que después de la digestión, los péptidos fosforilados pertenecen a los mismos dominios proteicos que los generados por hidrólisis. Además, los patrones obtenidos son similares, revelando la resistencia de estas regiones fosforiladas a la digestión gastrointestinal. Sólo se encontraron pequeñas diferencias entre las secuencias y, además, los presentes CPPs conocidos, tales como β-caseína f (1-25) 4P y αs1-caseína f (43-58) 2P y αs2-caseína f (56 -68) 3P y fragmentos de los mismos se encontraron después de la digestión digestiva simulada. Los resultados mostraron una alta homología (73%) entre las secuencias identificadas mediante ambos procedimientos de hidrólisis, demostrando así que el conjunto de péptidos formados son capaces de resistir la digestión y por tanto de transportar hasta el intestino los minerales que pudieran llevar conjugados.

EJEMPLO 3.- Determinación de la capacidad de transporte de minerales durante la digestión gástrica e intestinal

Para comprobar la eficacia de la conjugación de los CPPs formados con los minerales (en el presente caso K, Zn, Ca, Mg, Fe) se comparó la concentración de dichos minerales en la fase soluble de una digestión simulada *in vitro* usando el protocolo de Martos *et al*., (2010) con la obtenida con la misma cantidad del compuesto sin conjugar en tres momentos: 0 y 60 minutos en condiciones gástricas y 60 min en condiciones intestinales. Los resultados en % de mineral soluble se muestran en la Tabla 2.A y 2.B.

Tabla 2.A.- Porcentaje de mineral soluble

	KCl	KCl+HC	$ZnSO_4$	$ZnSO_4$ + HC	$Ca_3(PO_4)_3$	$Ca_3(PO_4)_3$ + HC
	% K	%K	% Zn	% Zn	% Ca	% Ca
0 min gástrico	60	10	15	6	50	15
60 min gástrico	90	40	50	40	40	30
60 min duodenal	10	60	15	65	12	70

Tabla 2.B.- Porcentaje de mineral soluble

	MgO	MgO+HC	$C_4H_8FeN_2O_4$	$C_4H_8FeN_2O_4$+HC
	% Mg	%Mg	% Fe	% Fe
0 min gástrico	20	10	25	15
60 min gástrico	70	60	70	65
60 min duodenal	25	70	50	75

La determinación de la cantidad de mineral se hizo por espectroscopia de absorción atómica.

Como se aprecia en las tablas 2.A y 2.B, el porcentaje de mineral soluble en la fase intestinal, donde se realiza la absorción, es claramente superior cuando el mineral ha estado conjugado con los CPPs favoreciendo su uso conjunto con los hidrolizados de la presente invención para, por ejemplo, conseguir equilibrar los niveles de testosterona y actividad antioxidante (Zn), o disminuir el cansancio y la fatiga (Mg, Fe). En el caso del Fe se evitarían además los efectos secundarios gastrointestinales normalmente asociados al consumo de las preparaciones que buscan la absorción de Fe, de especial interés para las mujeres.

EJEMPLO 4.- Hidrolizado de proteína de suero

El hidrolizado de proteína de suero (HPS) se obtuvo utilizando como sustrato un concentrado de proteínas de suero (WPC) de leche bovina rico en α-lactoalbumina y β-lactoglobulina que se dispersó en agua a una concentración del 5% (p/v). La hidrólisis se llevó a cabo con tripsina a pH entre 7 y 9, y con una relación enzima/sustrato del 1%-10% (p/p) a una temperatura de entre 37ºC y 40ºC durante 10 h. La inactivación del enzima se realizó mediante reducción del pH a 4,5 Posteriormente se secó en una estufa a 90ºC.

Los HPS citados en los siguientes ejemplos se produjeron siguiente este método, a no ser que se indique lo contrario. No se realizó ninguna separación de fracciones del hidrolizado, i.e. se usó un hidrolizado completo.

EJEMPLO 5.- Determinación de la expresión del enzima Óxido Nítrico Sintasa Epitelial (eNOS) en la aorta de animales de experimentación.

Se trabajó con 10 ratas WKY, se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura

(23 ± 2ºC) y humedad (40-70%) con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. La dieta estándar y el agua estuvieron disponibles ad libitum. Se realizaron 2 grupos de estudios detallados en la Tabla 3, con 5 individuos en cada grupo. En el grupo control la dieta estándar se complementó con celulosa y en el grupo HC la dieta estándar se complementó con HC.

Muestras de aortas congeladas obtenidas de dichas ratas fueron homogenizadas y centrifugadas a 2.000 rpm durante 1 min a 4ºC en buffer de lisis RIPA, los lisados fueron recogidos y centrifugados a 10.000 rpm durante 5 min a 4ºC. Los sobrenadantes fueron recogidos y la concentración de proteína fue determinada empleando un ensayo estándar (Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Las proteínas fueron eluidas en buffer Laemmli, y separadas por electroforesis mediante gel SDS–PAGE al 10%, y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Whatman, Germany). Las membranas fueron bloqueadas con 5% leche desnatada en buffer Tris con 0,1% de Tween durante 1h a temperatura ambiente y a continuación incubadas con el anticuerpo policlonal de conejo eNOS (1:5000, Bio-Rad, Laboratories Inc., USA) durante toda la noche a 4ºC en agitación. A continuación la membrana fue lavada varias veces con buffer TBS-Tween e incubadas con un anticuerpo secundario anti conejo unido al enzima HRP (1:1000, Bio-Rad, Laboratories Inc., USA) durante 1h a temperatura ambiente. La membrana fue revelada con quimioluminiscencia usando el sistema ECL Western blotting (Amersham-Pharmacia-Biotech) y la exposición a rayos X (Fuji, India). La densitometría fue realizada utilizando el programa Flurochem, (Alpha Innotech Corp.,USA). La proteína eNOS corresponde a la banda de 145-kDa y fue visualizada con referencia a marcadores de pesos moleculares. Los resultados fueron expresados como el ratio entre la señal del inmunoblot entre la banda del eNOS y la actina (control de carga) (Tabla 3).

La duración del tratamiento fue de 6 semanas. El peso fue monitorizado dos veces por semana. El análisis estadístico se llevó a acabó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con el programa estadístico SPSS.

Tabla 3.- Determinación de la expresión del enzima eNOS. El incremento en % se calcula entre la semana 6 y la semana 0 de cada grupo.

Grupo	Composic.	mg/kg/día	**Ratio eNOS/ α-actina**				Incremento %	d.s.
			Tiempo (semanas)					
			0	2	4	6		
1	Control	500	1,10	1,12	1,11	1,11	0,9	<0,01
2	HC	500	1,11	1,35	1,78	1,80	62,1	<0,01

Como se puede ver en esta tabla, las mediciones se estabilizaron a partir de la cuarta semana. La administración del HC provoca un importante aumento de la expresión de eNOS in vivo, en concreto un aumento que llega a ser superior al 62 % con respecto al control.

De manera interesante, los inventores han visto que cuando el HC se separa en dos fracciones, una menor y otra mayor de 3.000 Da, la suma de la inducción de eNOS de cada una de estas dos fracciones es mucho menor que cuando se usa un HC completo (no sometido a separación de fracciones, como en este ejemplo) (datos no mostrados).

EJEMPLO 6.- Determinación de la disponibilidad en plasma de Arginina

Se analizó si el HC tiene algún efecto en los niveles de arginina en plasma. La arginina se cuantificó por cromatografía de intercambio iónico. Se analizaron muestras de 6 cerdos adultos (35-45 Kg) alimentados con la dieta habitual una vez al día, sin acceso a agua. 7 horas después de la ingesta de comida, se les permitió el acceso a agua incluyendo en ella 10 g de HC (grupo HC, 3 cerdos) o 10 g de caseína sin digerir (control, 3 cerdos) y se tomando muestras de sangre, cada 30 minutos durante 3 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.- Concentración de arginina (µmol/L) en el tiempo.

Tiempo (min)	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Control	55	52	130	135	138	138	140	140	139	135	130	120	110
HC	54	82	205	196	190	175	175	160	155	148	125	125	122

Como se muestra en esta tabla, la concentración de arginina es significativamente más alta que el control, especialmente durante las tres horas siguientes a la ingesta de HC.

La arginina es necesaria para la producción de NO. Así, sin estar unido por ninguna teoría, el aumento de los niveles de arginina en plasma producido por HC permite la obtención de NO siempre que la eNOS esté activa.

EJEMPLO 7.- Determinación de la actividad IECA *in vitro*

La actividad IECA se determinó espectrofotométricamente. El compuesto empleado como sustrato de la ECA fue el Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) (Sigma). HHL se disolvió en tampón borato sódico 0,1 M con NaCl 0,3 M para obtener una concentración final de 5 mM de HHL a un pH de 8,3. A 100 µL de sustrato se le añadieron 40 µL de cada una de las muestras cuya

actividad inhibidora de la ECA se quería determinar. Se añadió 2 mUs del enzima ECA (EC 3.4.15.1, 4,7 U/mg de proteína, Sigma), disuelta en glicerol al 50%, y diluida 1/10 en agua Milli-Q en el momento de realizar el ensayo. La reacción se llevó a cabo a 37ºC durante 30 minutos. El enzima se inactivó descendiendo el pH con 150 µL de HCl 1N. El ácido hipúrico formado se extrajo con 1000 µL de acetato de etilo. Tras agitación con vortex durante 20 segundos, se centrifugó a 4.000 × g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se extrajeron 750 µL de la fase orgánica y se evaporaron por calentamiento a 95ºC durante 15 minutos. El residuo de ácido hipúrico se re-disolvió en 800 µL de agua Milli-Q y, tras agitar, se midió la absorbancia a 228 nm en un espectrofotómetro DU-800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EEUU). El blanco y el control positivo recibieron el mismo tratamiento que el resto de las muestras, sin embargo, al blanco se le añadió agua en vez de enzima y al control agua en vez de muestra.

La actividad IECA se expresó como concentración de péptido (µM) necesaria para inhibir el 50% de la actividad del enzima (Tabla 5). Para llevar a cabo su cálculo, se representó el porcentaje de actividad inhibidora de la ECA frente a la concentración de la muestra (mínimo 5 puntos) y se realizó un ajuste no lineal de los datos con el software PRISM versión 4.02 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). La actividad de cada muestra se determinó por triplicado, y para calcular el porcentaje de actividad inhibidora de la ECA se empleó la siguiente fórmula:

Actividad inhibidora de la ECA (%) = $(A_C-A_M) / (A_C-A_B) \times 100$

A_C: Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ECA sin inhibidor (control).

A_B: Absorbancia del compuesto Hipuril-Histidil-Leucina que no ha reaccionado y que se ha extraído con el acetato de etilo (blanco).

A_M: Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ECA en presencia de sustancias inhibidoras (muestra).

Tabla 5.- Actividad inhibitoria de la ECA expresada en µM de péptidos.

Péptido	**Proteína de origen/Fragmento**	**Inhibición(µM)**
RYLG	alfa s1-caseina f(90-93)	220,39
YLGY	alfa s1-caseina f(91-94)	41,59
YLG	alfa s1-caseina f(91-93)	>3.000
YFYPEL	alfa s1-caseina f(144-149)	262,36
YFYPE	alfa s1-caseina f(144-148)	123,33
YFY	alfa s1-caseina f(144-146)	81,61

En esta tabla se muestran las secuencia de los péptidos identificados y su localización en la proteína de origen, junto con la actividad inhibitoria de la ECA determinada *in vitro*. Además, estos péptidos muestran actividad antihipertensiva *in vivo* en ratas hipertensas (datos no mostrados).

De manera interesante, los inventores han visto que cuando el HC se separa en dos fracciones, una menor y otra mayor de 3.000 Da, la actividad IECA del HC completo es mayor que la que se le asignaría a la fracción menor de 3000 Da (datos no mostrados)

EJEMPLO 8.- Determinación de la actividad inhibidora del enzima DPP-IV *in vitro*

Se utilizó el hidrolizado de proteínas del suero producido según el Ejemplo 4. La actividad inhibidora del enzima DPP-IV se determinó mediante un método enzimático *in vitro*. Este ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos usando diprotina A (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA) como control positivo. Se mezclaron 15 µL del enzima recombinante humana DPP-IV (0,01 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 35 µL de la muestra a analizar (a diferentes concentraciones) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron 50 µL del tampón de ensayo conteniendo el sustrato cromogénico H-Gly-Pro-p-nitroanilina (Enzo Life Sciences Inc.) a una concentración de 200 µM y se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas (BMG LABTECH Inc., Champigny surMarne, France) durante 30 minutos a intervalos de 2 minutos. Se representaron los datos de absorbancia frente al tiempo y se expresaron como el porcentaje de actividad enzimática residual en presencia de la muestra comparado con el control (sin muestra añadida). Para cada muestra, se llevaron a cabo tres ensayos diferentes para representar la curva dosis-respuesta y calcular el valor de IC50 (concentración de proteína necesaria para inhibir el 50% de la actividad del enzima DPP-IV).

Para analizar la actividad inhibitoria del enzima DPP-IV se fraccionó el hidrolizado y posteriormente, en aquellas fracciones que presentaron mayor actividad, se estudiaron mediante HPLC-MS las secuencias peptídicas más abundantes y potencialmente responsable de la actividad de la fracción.

Para la separación de los péptidos se empleó una columna de fase inversa Mediterránea Sea 18 (150 × 2,1 mm d.i., 5 µm de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona). El disolvente A fue una mezcla de agua y ácido trifluoroacético (1000:0,37) y el disolvente B una mezcla de acetonitrilo y ácido trifluoroacético (1000:0,27). Se empleó un gradiente lineal

del 0 al 45% de B en 60 minutos, a un flujo de 0,2 mL/min. Las muestras se inyectaron a una concentración de 0,884 mg de proteína/mL con un volumen de inyección de 50 µL y su elución se monitorizó a 214 nm. El equipo de HPLC se acopló a un espectrómetro de masas Esquire-3000 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania), dirigiéndose el flujo completo a la salida del detector hacia el nebulizador del espectrómetro de masas. El equipo utilizó nitrógeno como gas nebulizador y de secado (60 psi, 8 L/minutos, 350ºC), y helio a una presión estimada de 5 bares. Los espectros de masas se adquirieron en un intervalo entre 100 y 1500 m/z. El capilar se mantuvo con un voltaje de 4 kV. La señal de los análisis de espectrometría de masas se obtuvo de la media de 15 espectros y para los análisis de espectrometría de masas en tándem se utilizó el valor medio de 5 espectros. El límite de intensidad para llevar a cabo los análisis de espectrometría de masas en tándem fue de 50.000 unidades arbitrarias. Los iones precursores se aislaron con un intervalo de 4 m/z y se fragmentaron con una rampa de voltaje optimizada para cada fracción. Los datos espectrales se procesaron y transformaron a valores de masas utilizando el programa Data Analysis (versión 4.0, Bruker Daltonik). El programa BioTools (versión 3.1, Bruker Daltonik) se empleó para procesar los espectros de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y llevar a cabo la secuenciación de los péptidos.

Tabla 6- Secuencia de los péptidos identificados, localización en la proteína de origen, y actividad inhibitoria de la DPP-IV (expresada como porcentaje de inhibición a la concentración ensayada de 100 µM).

Péptido (SEC ID Nº)	**Proteína de origen/Fragmento**	**Inhibición (%)**
DAQSAPLR (26)	Beta lactoglobulina f(33-40)	8,03
HTSGYDTQ (27)	Alfa lactoalbumina f(32-39)	28,74
EQLTQ (28)	Alfa lactoalbumina f(1-5)	5,61
KIPAVF (29)	Beta lactoglobulina f(77-82)	11,33
IPAVF (30)	Beta lactoglobulina f(78-82)	32,8

Los cinco péptidos seleccionados contribuyen con un porcentaje interesante de inhibición y los cinco juntos contribuyen a más del 80% de la actividad total ensayada.

EJEMPLO 9.- Evaluación de la actividad antioxidante (Scanvenger) frente al radical superóxido de los hidrolizados HC, HPS y su combinación

Se mezclaron 80 µL de caseína intacta, proteínas de suero intactas, HC y HPS (a 5 mg/mL) con 80 µL de buffer Tris-HCl (Merk) 50 mM, a un pH de 8,3 en un lector de absorbancia en

placas de 96 pocillos. Seguidamente se adicionaron 40 µL de Pyrogallol (Merk) 1,5 mM en HCl, 10mM. El ratio de polimerización de Pyrogallol inducida por el anión superóxido (ΔAs/min) se midió por aumento de absorbancia a 320 nm durante 5 min a 23ºC. Como control positivo se utilizó Glutation. Como blanco (ΔAc/min) se utilizó el buffer Tris-HCl.

El índice de actividad Scavenger (IAS) frente al superóxido se midió con la siguiente fórmula

IAS = [(ΔAc/min) - (ΔAs/min)] / (ΔAc/min) x 100

Los resultados (%) fueron los siguientes mostrados en la Tabla 7. Las pruebas están hechas con la misma cantidad de proteína o hidrolizado.

Tabla 7.- IAS de distintas muestras.

Muestra	**IAS**
Caseína	30
Proteínas de suero	20
Caseína+Proteínas de suero (1:1)	36
HC	55
HPS	35
HC+HPS (HC:HPS=1:1)	70
HC+HPS (HC:HPS=10:1)	67
Glutation	98

Como se observa en la anterior tabla el efecto conjunto de todas las proteínas intactas frente a la caseína sola mejora el resultado un 20% (36 frente a 30). Sin embargo, cuando se combinan los hidrolizados la capacidad antioxidante sube un 27,3% (70 frente a 55). Además, cuando se prueba la relación 10:1 la mejora es del 21,8% lo que prueba su efecto sinérgico. Esta mejora tiene gran interés cuando se formula un complemento alimenticio en donde la dosis total debe, además de ser eficaz, no superar un peso total de dosis diaria que sea rechazado por el consumidor.

Siendo el Glutation el principal antioxidante de las células, se observa el alto porcentaje que consigue el HC+HPS (10:1), un 68% (67 frente a 98) en comparación con lo que consiguen las proteínas intactas.

Los inventores han visto que la composición que comprende HC y HPS tiene una actividad antioxidante inesperadamente alta frente a los ingredientes de la composición por separado,

lo cual, sin querer estar atado por la teoría, sugiere que la composición de la invención que comprende HC y HPS puede ayudar a evitar la oxidación del NO, permitiendo su actividad, en especial la formación de cGMP.

EJEMPLO 10.- Disfunción eréctil

Se llevó a cabo un ensayo con 140 hombres que habían acudido al médico, a la farmacia, al dietista o al médico para resolver su DE sin declarar otras patologías relacionadas.

El estudio se llevó a cabo durante 6 meses y siguió la metodologia “doble ciego”. Por otra parte, dado que una de las poblaciones de riesgo de los medicamentos contra la disfunción sexual son los individuos hipertensos, se analizó también en este estudio si la composición de la presente invención tenía algún efecto en la tensión arterial (TA), permitiendo la participación de personas con hipertensión leve.

Los participantes tenían:

Edad: 35-79 años (media: 59).

Peso: 72-120 Kg (media: 87 Kg).

Tensión arterial:

- 92 normotensos: sistólica 100-145 mmHg (media 115), diastólica 58-80 mmHg (media 70)
- 48 con hipertensión leve: sistólica 130-170 mmHg (media 135), diastólica 80-110 mmHg (media 89).

Se formaron los grupos que se detallan en la Tabla 8. Las composiciones se tomaron incluidas en 2 capsulas con agua, fuera de las comidas. El extracto de GB usado fue extracto seco de GB estandarizado.

Se pidió a los participantes que anotasen el momento en el que notaron alguna reacción. Se realizaron tres comprobaciones incluyendo la medición de la TA, al Inicio, a los 3 meses y alos 6 meses.

A los participantes se les preguntó si habían notado: mayor dureza del pene, erección matinal, erección espontánea, aumento del deseo sexual, cuándo notó la mejora, y en conjunto cómo calificaban la mejora (leve o significativa). Los resultados se detallan en la Tabla 8:

Tabla 8.- Resultados ensayo DE

Grupo (n)	**Dosis diaria**	**Reacción nula** (individuos/%)	**Reacción positiva**		
			Leve (individuos/%)	Significativa (individuos/%)	TOTAL (individuos/%)
Placebo (20)	Celulosa 1,1 g	19 / 95	1 / 5	0 / 0	1 / 5
HC (20)	1,1 g	13 / 65	7 / 35	0 / 0	7 / 35
GB (20)	30 mg	18 / 90	2 / 10	0 / 0	2 / 10
HC+GB (20)	1,1 g + 30 mg	6 / 30	2/ 10	12 / 60	14/ 70
HC+ HPS (20)	1,1 g (HC:HPS 10:1)	12/ 60	8/ 40	0 / 0	8 /40
HC+HPS+ GB (20)	1,1 g (HC:HPS 10:1) + 30 mg	3/ 15	2 / 10	15 / 75	17/ 85
HC-Zn+ HPS+GB (20)	1,1 g (HC:HPS 10:1) + 30 mg	2/ 10	2 / 10	16 / 80	18 / 90

Como puede verse en esta tabla, las combinaciones HC+GB y HC+HPS+GB consiguen resultados en la reacción positiva total (70% y 85% respectivamente) muy superiores a HC (35%), HC+HPS (40%) y GB (10%), comprobándose así la acción sinérgica de la combinación del/los hidrolizado(s) con GB. Además, las reacciones significativas sólo aparecen cuando se usan los hidrolizados con GB: HC+GB (60%), HC+HPS+GB (75%). Y si además se añade Zn (HC-Zn+HPS+GB) los resultados mejoran tanto en reaccion siginificativa (80%) como en total (90%)

El inicio de los efectos se detectó entre la tercera y la cuarta semana (media: 21 días) y de manera interesante, dichos efectos se mantuvieron durante toda la duración del ensayo. Así, se consigue un tratamiento a largo plazo de la DE mediante administración de una composición de grado alimentario que no muestra efectos secundarios relevantes y permite su uso continuado. Esto es una gran ventaja ya que muchos de los tratamientos existentes en la actualidad, son para uso puntual ya que su uso continuado presenta riesgos para la salud.

En cuanto a los efectos secundarios, sólo 9 partipantes notaron algún efecto secundario que consistió en un ligero dolor de cabeza en la primera semana que cedió en 4 ó 5 días de continuar el tratamiento. Así, la presente invención proporciona una composición eficaz en el tratamiento de la DE y practicamente libre de efectos secundarios.

En relación con los individuos hipertensos conviene destacar que sorprendentemente, más del 75% de los participantes que consumieron la composición con HC o HC+HPS con o sin GB, mostraron una bajada moderada de tensión del orden de 7 mm Hg (sistólica) y 4 mm Hg (diastólica), pero todos los participantes normotensos mantuvieron sus niveles de TA. Estos resultados son muy favorables por cuanto permiten el uso de la composición de la invención tanto por normotensos como por hipertensos, viendo estos últimos como el producto puede también ayudarles a normalizar sus valores de TA

También es importante destacar que 7 de estos participantes, que padecían patologías crónicas leves, reportaron importantes mejoras en la sintomatología de las mismas (3 en degeneración macular, 3 en rinitis crónica y 1 en púrpura de Schamberg) lo que avala que la composición de la presente invención puede servir para tratar o contribuir en el tratamiento (coadyuvante) de numerosas patologías relacionadas con la disfunción endotelial vascular, como son degeneración macular, rinitis crónica o púrpura de Schamberg.

Por último conviene subrayar que los efectos se consiguen con cantidades de producto final muy bajas, de poco más de un gramo, que pueden incluirse en uno o dos pequeños comprimidos o cápsulas, lo que confiere a este producto una especial facilidad para que el consumidor mantenga el tratamiento y la pauta de administración, ya que el consumidor rechaza presentaciones en cantidades altas.

EJEMPLO 11.- Disfunción sexual femenina

Este estudio se realizó en 96 mujeres, que habían acudido al médico especialista (urólogos o ginecólogos) para mejorar su función sexual, porque padecían disfunción sexual. Las mujeres tenían entre 40 y 62 años (edad media 49 años). Se hicieron los grupos mostrados en la Tabla 9 (16 mujeres por grupo) y se administró la dosis usada en el ejemplo anterior. Se siguió la metodología de “doble ciego”.

El estudio se llevó a cabo durante 12 semanas. Durante la duración del estudio, se realizaron una serie de cuestionarios con el fin de determinar si habían experimentado alguna mejora en su función sexual y de ser así, de qué tipo y en qué medida. Así, se clasificaron los distintos individuos como “reacción nula” si no habían experimentaron ninguna mejoría y como “reacción positiva” si había experimentado alguna mejoría. A estos últimos, se les preguntó además por ciertos detalles de la mejoría. En concreto, se les preguntó si habían notado: aumento de la sensibilidad clitoriana, disminución de la

sequedad vaginal, aumento del deseo sexual, cuándo notó la mejora, y en conjunto cómo calificaban la mejora (leve o significativa).

Las composiciones se tomaron incluidas en capsulas con agua, fuera de las comidas. Se realizaron tres comprobaciones, al inicio, a las 8 semanas y las 12 semanas. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 9.

Tabla 9.- DSF

Composición	Reacción nula (Individuos / %)	Reacción positiva		
		Leve (Individuos / %)	Significativa (Individuos / %)	TOTAL (Individuos / %)
Placebo	15 / 94	1 / 6	0 / 0	1 / 6
HC	13 / 81	3 / 19	0 / 0	3 / 19
GB	14 / 88	2 / 13	0 / 0	2 / 13
HC+GB	7 / 44	4 / 25	5 / 31	9 / 56
HC+HPS	12 / 75	4 / 25	0 / 0	4 / 25
HC+HPS+GB	5 / 31	4 / 25	7 / 44	11 / 69

Como puede verse en esta tabla, las combinaciones HC+GB y HC+HPS+GB consiguen resultados en la reacción positiva total (56% y 69% respectivamente) muy superiores a HC (19%), a HC+HPS (25%) y al GB (13%), comprobándose así la acción sinérgica del/los hidrolizado(s) con GB. Además las reacciones significativas sólo aparecen cuando se usan los hidrolizados con GB: HC+GB (31%) y HC+HPS+GB (44%).

Los efectos (leves y/o significativos) fueron notados en todos los casos entre la cuarta y quinta semana del ensayo (media 32 dias) y los efectos se mantuvieron durante el tiempo restante hasta el final del estudio (12 semanas).

REIVINDICACIONES

1.- Composición caracterizada porque comprende:

a) un hidrolizado de caseína de leche (HC) caracterizado porque aumenta la expresión y/o actividad de eNOS *in vivo* y/o aumenta los niveles de arginina en plasma *in vivo* y/o tiene actividad antioxidante;

b) un extracto de *Ginkgo biloba* (GB); y opcionalmente

c) un hidrolizado de proteínas de suero lácteo de leche (HPS) caracterizado porque tiene actividad inhibidora del enzima DDP-IV *in vitro* y/o tiene actividad antioxidante.

2.- Composición según la reivindicación 1, donde el HC aumenta la expresión y/o actividad de eNOS *in vivo*, aumenta los niveles de arginina en plasma *in vivo* y tiene actividad antioxidante.

3.- Composición según la reivindicación 1 ó 2, donde el HC comprende al menos un caseinfosfopéptido.

4.- Composición según la reivindicación 3, donde la secuencia del caseinfosfopéptido se selecciona del grupo formado por SEC ID Nº 1 - SEC ID Nº 21.

5.- Composición según la reivindicación 3 ó 4, donde el HC comprende 21 caseinfosfopéptidos cuyas secuencias son SEC ID Nº 1 - SEC ID Nº 21.

6.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, donde el/los CCP(s) está(n) unido(s) a un mineral.

7.- Composición según la reivindicación anterior, donde el mineral se selecciona de magnesio, hierro, potasio, calcio, zinc y combinaciones de los mismos.

8.- Composición según la reivindicación anterior, donde el mineral es zinc.

9.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el HC comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis péptidos seleccionados del grupo formado por los péptidos de secuencia YFY, YLG, YLGY (SEC ID Nº 22), RYLG (SEC ID Nº 23), YFYPE (SEC ID Nº 24), YFYPEL (SEC ID Nº 25).

10.- Composición según la reivindicación anterior, donde el HC comprende uno, dos o tres péptidos seleccionados del grupo formado por los péptidos de secuencia YFY, YFYPE (SEC ID Nº 22) y YFYPEL (SEC ID Nº 23).

11.- Composición según la reivindicación anterior, donde le HC comprende uno o dos péptidos de secuencia YFYPE (SEC ID Nº 22) y YFYPEL (SEC ID Nº 23).

12.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el HPS tiene actividad inhibidora del enzima DDP-IV *in vitro* y tiene actividad antioxidante.

13.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el HPS comprende uno, dos, tres, cuatro o cinco péptidos seleccionados del grupo formado por los péptidos de secuencia DAQSAPLR (SEC ID Nº 26), HTSGYDTQ (SEC ID Nº 27), EQLTQ (SEC ID Nº 28), KIPAVF (SEC ID Nº 29) e IPAVF (SEC ID Nº 30).

14.- Composición según la reivindicación anterior, en la que el HPS comprende uno o dos péptidos seleccionados de SEC ID Nº 27 y SEC ID Nº 30.

15.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende 45%-95% de HC, 1%-9% de GB y, optativamente HPS.

16.- Composición según la reivindicación anterior, que comprende 45%-95% de HC, 1%-9% de GB y 0%-30% de HPS.

17.- Composición según la reivindicación anterior, que comprende 45%-95% de HC, 1%-9% de GB y 3%-30% de HPS.

18.- Composición según la reivindicación anterior, que comprende 65%-95% de HC, 1%-6% de GB y 3%-15% de HPS.

19.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, que además comprende un 0,2%-20% de mineral, preferiblemente 0,2-10%.

20.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende HPS y donde la proporción HC:HPS es de 2:1 a 15:1, preferentemente de 7:1 a 12:1.

21.- Medicamento, suplemento alimenticio, bebida o producto alimenticio caracterizado porque comprende una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-20.

22.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-20 para su uso en medicina.

23.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con disfunción endotelial.

24.- Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para su uso como coadyuvante en el tratamiento de un trastorno relacionado con disfunción endotelial.

25.- Composición según la reivindicación 23 ó 24, donde el trastorno relacionado con disfunción endotelial se selecciona del grupo formado por aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, hipertensión, hipercolesterolemia, hiperglucemia, ictus, apoplejía, infarto de miocardio, enfermedad vascular periférica, angina de pecho, insuficiencia cardiaca, disfunción ventricular diastólica y/o sistólica, macro y microangiopatía en pacientes con diabetes, lesión tisular relacionada con isquemia y reperfusión, disfunción sexual, degeneración macular, rinitis crónica, púrpura de Schamberg y combinaciones de las mismas.

26.- Composición según la reivindicación 23 ó 24 donde el trastorno relacionado con disfunción endotelial es disfunción sexual, particularmente disfunción eréctil o disfunción sexual femenina.

27.- Un kit de partes que comprende:

a) un primer recipiente con un hidrolizado de caseína según se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-11;

b) un segundo recipiente con un extracto de *Ginkgo biloba*; y opcionalmente

c) un tercer recipiente con hidrolizado de proteína de suero láctico según se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 12, 13 y 14.

28.- Kit según la reivindicación 27 para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con disfunción endotelial.

29.- Uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, o de un

suplemento alimenticio, bebida o producto alimenticio según la reivindicación 21, o del kit según la reivindicación 27 para mejorar el rendimiento físico, deportivo y/o sexual.

30.- Método para preparar un HC como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

a) Proporcionar un sustrato lácteo apropiado, preferentemente caseína;

b) Disolver o suspender dicho sustrato en agua o en una disolución tampón, a un pH adecuado para la acción proteolítica del enzima gástrica, preferentemente pepsina, en condiciones gástricas, preferiblemente a pH de entre 2 y 4 y a temperatura de entre 37ºC y 40ºC;

c) Añadir el enzima gástrico, en una relación enzima/sustrato de entre 1/100 y 10/100 (p/p);

d) Mantener la reacción durante un tiempo de entre 6 y 28 horas, preferiblemente 25-28 horas, y en dicho tiempo añadir entre 1-10% de enzima, preferentemente la misma cantidad de enzima que en la etapa c), en intervalos crecientes de entre 4 y 8 horas;

e) inactivar el enzima, preferentemente subiendo el pH a 7-9;

f) Opcionalmente, añadir un compuesto soluble en agua que contiene un mineral e incubar, preferentemente a entre 37ºC y 40ºC y/o durante entre 0,5 y 1 horas;

g) Desecar.

31.- Método según la reivindicación anterior, que comprende las etapas a)-e) como se han definido en la reivindicación anterior y a continuación las siguientes etapas:

f) Establecer una temperatura de entre 37ºC y 40ºC y un pH de condiciones intestinales, preferiblemente pH 7-9, añadir un enzima intestinal, preferentemente tripsina, en una relación enzima/sustrato de entre 1/100 y 10/100 (p/p), e incubar durante un tiempo de entre 2 y 6 horas, preferentemente 3-5 horas;

g) Opcionalmente, añadir un compuesto soluble en agua que contiene un mineral e incubar, preferiblemente a entre 37ºC y 40ºC, más preferentemente a la misma temperatura y pH que en la etapa anterior, y/o durante entre 0,5 y 1 horas;

h) Inactivar el enzima intestinal; y

i) desecar.

32.- Método para preparar un HPS como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 12, 13 y 14 caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

a) Proporcionar un sustrato lácteo apropiado, preferentemente proteína de suero lácteo;

b) Disolver o suspender dicho sustrato en agua o en una disolución tampón, a un pH adecuado para la acción proteolítica de un enzima intestinal, preferentemente tripsina, en

condiciones intestinales, preferentemente a un pH entre 7 y 9, y a una temperatura de entre 37ºC y 40ºC;

c) Añadir enzima intestinal, preferiblemente tripsina, en una relación enzima/sustrato de entre 1/100 y 10/100 (p/p);

d) Mantener la reacción durante un tiempo de entre 6 y 24 horas, preferiblemente entre 8 y 14 horas;

e) Inactivar el enzima intestinal; y

f) Desecar.

33.- Método para preparar la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

i) llevar a cabo el método según la reivindicación 30 ó 31, y opcionalmente el método según la reivindicación 32; y

ii) mezclar en la cantidad deseada el/los hidrolizado(s) obtenido(s) en la etapa i) y un extracto de *Ginkgo biloba*.

34.- Composición que comprende:

a) un hidrolizado de caseína de leche (HC) caracterizado porque aumenta la expresión y/o actividad de eNOS *in vivo,* y/o aumenta los niveles de arginina en plasma *in vivo,* y/o tiene actividad antioxidante; y

b) un hidrolizado de proteínas de suero lácteo de leche (HPS) caracterizado porque tiene actividad inhibidora del enzima DDP-IV *in vitro* y/o tiene actividad antioxidante.

35.- Composición según la reivindicación anterior donde el HC aumenta la expresión y/o actividad de eNOS *in vivo* y aumenta los niveles de arginina en plasma *in vivo* y tiene actividad antioxidante y el HPS tiene actividad inhibidora del enzima DDP-IV *in vitro* y tiene actividad antioxidante.

36.- Composición según la reivindicación anterior, en la que la proporción HC:HPS es de 2:1 a 15:1, preferentemente de 7:1 a 12:1.

37.- Uso de una composición según la reivindicación 35 ó 36 como agente antioxidante.

38.- Método para preparar la composición según la reivindicación 34, 35 ó 36 caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

i) llevar a cabo el método según la reivindicación 30 ó 31;

ii) llevar a cabo el método según la reivindicación 32; y

ii) mezclar en la cantidad deseada los hidrolizados obtenidos en las etapas i) y ii).

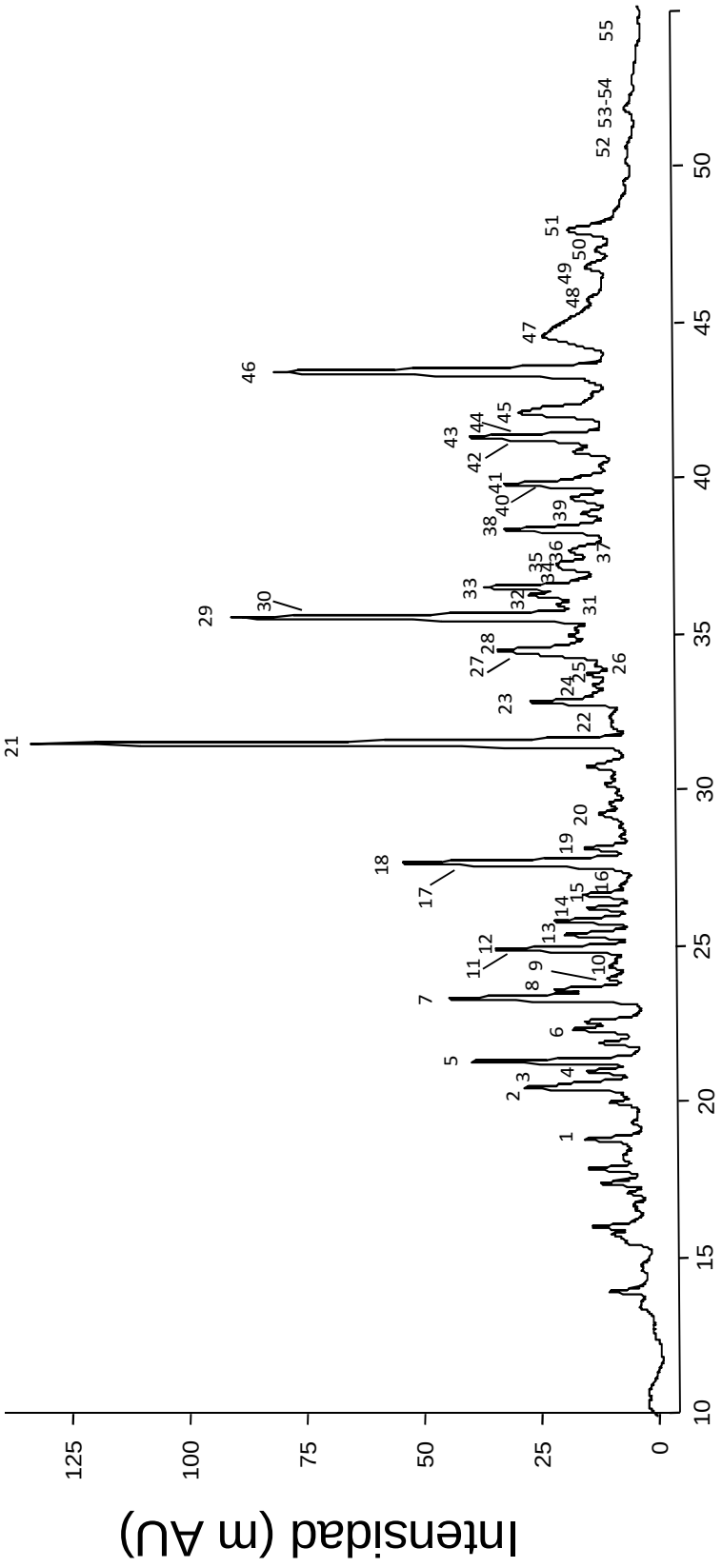
Intensidad (m AU)
0
25
50
75
100
125
Tiempo (min)
10
15
20
25
30
35
40
45
50
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53-54
55

FIG. 1

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201830959

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 04.10.2018

(32) Fecha de prioridad: **21-09-2018**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
Y	SANCHEZ, D. et al. "Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of hypertension and involves cardiovascular benefits". PHARMACOLOGICAL RESEARCH, 01/05/2011, Vol. 63, páginas 398-404, <DOI: 10.1016/j.phrs.2011.01.015>. Todo el documento.	1-29, 33
Y	CRUZ-HUERTA, E. et al. "Caseinophosphopeptides released after tryptic hydrolysis versus simulated gastrointestinal digestion of a casein-derived by-product". FOOD CHEMISTRY, 01/02/2015, Vol. 168, páginas 648-655, <DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.07.090>. Todo el documento.	1-29, 33
Y	LI, H. et al. "Traditional Chinese medical therapy for erectile dysfunction". TRANSLATIONAL ANDROLOGY AND UROLOGY. Abril 2017, Vol. 6, páginas 192-198, <DOI: 10.21037/tau.2017.03.02>. Todo el documento, especialmente Tabla 1, línea 3.	1-29, 33
Y	WO 2015000986 A1 (INTERNATIONAL NUTRITION RESEARCH COMPANY) 08/01/2015, reivindicaciones.	1-29, 33
Y	SILVEIRA, S.T. et al. "Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β-lactoglobulin". FOOD CHEMISTRY, 15/11/2013, Vol. 141, páginas 1072-1077, <DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.03.056>. Todo el documento, especialmente Tabla 1; apartado 3.3.	1-29, 33
A	ONO, T. et al. "Casein phosphopeptides from casein micelles by successive digestions with pepsin and trypsin". BIOSCI. BIOTECHNOL. BIOCHEM.01/01/1998, Vol. 62, páginas 16-21, <DOI: 10.1271/bbb.62.16>. Todo el documento, especialmente página 20, Tabla II.	1-29, 33
A	LEMIEUX, L. et al. "Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography to the separation of peptides from phosphorylated and dephosphorylated casein hydrolysates". JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, 1989, Vol. 473, páginas 189-206, <DOI: 10.1016/S0021-9673(00)91301-3.>. Todo el documento especialmente Tabla 1.	1-29, 33

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: 1-29, 33

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
07.06.2019	M. Novoa Sanjurjo	1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/01 (2006.01)
A61K36/16 (2006.01)
A23J3/34 (2006.01)
A23L33/105 (2016.01)
A61P15/10 (2006.01)

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

A61K, A23J, A23L, 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, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, INTERNET