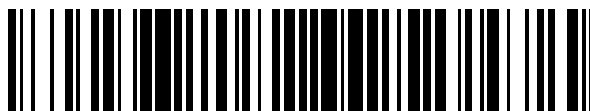


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 894**

51 Int. Cl.:

A23J 3/34 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01)
A61K 38/01 (2006.01)
A23J 1/04 (2006.01)
A61K 35/56 (2015.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2011 E 11832114 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2627192**

54 Título: **Hidrolizados de proteínas animales de origen marino con propiedades neuroprotectoras**

30 Prioridad:

14.10.2010 FR 1004043

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

04.09.2015

73 Titular/es:

**V. MANE FILS (100.0%)
620, route de Grasse
06620 Bar sur Loup, FR**

72 Inventor/es:

**LABATUT, MARIE-LUCE y
LE DENMAT, SOLANGE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 544 894 T3

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

DESCRIPCIÓN

Hidrolizados de proteínas animales de origen marino con propiedades neuroprotectoras

5 La invención se refiere a tratamientos para reducir los factores de riesgo asociados al desarrollo de trastornos neurodegenerativos asociados al envejecimiento, a prevenir la aparición de estos trastornos y/o a ralentizar su desarrollo. La invención se refiere más particularmente a composiciones activas destinadas a ser administradas por vía oral, para preservar la salud del tejido nervioso de un individuo/paciente. Estas composiciones, del tipo complemento alimenticio, nutracéutico y medicamento, que comprenden un hidrolizado de proteínas animales de origen marino, poseen propiedades neuroprotectoras comprobadas.

10 La invención se refiere igualmente a ingredientes, alimenticios o farmacéuticos, destinados a formar parte de la composición de estos complementos alimenticios, nutracéuticos o medicamentos; estos ingredientes contienen un hidrolizado de proteínas animales de origen marino con propiedades neuroprotectoras comprobadas.

El envejecimiento es un proceso complejo, lento y progresivo, con múltiples efectos, que implica un conjunto de modificaciones anatómicas, biológicas y fisiológicas. Induce una disminución y/o una disfunción progresivas de las funciones físicas y/o intelectuales de un individuo.

15 En el sistema nervioso, el envejecimiento se manifiesta por un deterioro progresivo del funcionamiento de las células nerviosas, que llega hasta la muerte celular. En función de las regiones alcanzadas, los trastornos afectarán la capacidad motriz, el lenguaje, la memoria, el comportamiento, la concentración, el estado de ánimo... Estos trastornos, llamados trastornos neurodegenerativos (que, en ciertos casos, pueden corresponder a demencias seniles, trastornos sintomáticos de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson...) manifiestan la
20 gravedad de los ataques que afectan al tejido nervioso.

Entre los factores identificados como responsables del envejecimiento del sistema nervioso, con frecuencia se menciona el estrés oxidante. Más que cualquier otro órgano, el cerebro es particularmente sensible a la acumulación de radicales libres, causa principal del estrés oxidante.

25 El cerebro posee, en efecto, un metabolismo aerobio elevado, y a pesar de que sólo representa el 2% del peso del cuerpo humano, utiliza más del 20% del oxígeno respirado. Por tanto, es el centro de una producción elevada de radicales libres. Si en un estado fisiológico normal consigue regular eficazmente el nivel, con la edad, esta aptitud se encuentra disminuida, acentuando el riesgo de accidentes neurodegenerativos.

30 La invención pretende proporcionar agentes activos, antioxidantes, que sean eficaces en la neuroprotección y que puedan ser prescritos para prevenir el desarrollo de trastornos neurodegenerativos asociados al envejecimiento y/o reducir los factores de riesgo asociados al desarrollo de estos trastornos. Principalmente, la invención tiene como objetivo proporcionar agentes antioxidantes aptos para conservar la salud del tejido nervioso, en particular con relación al estrés oxidante.

35 Otro objeto de la invención es proporcionar agentes antioxidantes con efectos neuroprotectores, que sean 100% naturales y eficaces cuando se administran por vía oral, por ejemplo, en forma de un medicamento por vía oral, un complemento alimenticio y/o un nutracéutico. En este mismo contexto, la invención también pretende proponer ingredientes integrantes de dichos agentes antioxidantes, que serán destinados a ser utilizados en la preparación de medicamentos, complementos alimenticios y/o nutracéuticos (es decir, un alimento listo para su empleo que tiene beneficios para la salud).

40 Las solicitudes de patente WO 2006/084383 y WO 2009/101146 describen hidrolizados de proteínas procedentes del salmón, la caballa, la faneca, el bacalao y el carbonero.

El artículo de VANDANJON et al., *J. Food Engineer.*, vol. 95, nº 1, 1 noviembre 2009, páginas 36-44, describe un hidrolizado de proteínas procedentes de la bacaladilla.

El artículo de SAMARANAYAKA et al., *Food Chemistry*, vol. 107, nº 2, 19 noviembre 2007, páginas 768-776, describe el efecto antioxidante de un hidrolizado de proteínas procedente de la merluza.

45 El artículo de SORENSEN et al., *Nahrung*, vol. 48, nº 1, febrero 2004, páginas 53-56, describe que un hidrolizado de proteínas procedentes del salmón es capaz de inhibir la prolil-endopeptidasa.

50 La invención se refiere así a hidrolizados de proteínas animales de origen marino que poseen propiedades neuroprotectoras. Estos hidrolizados proceden de al menos una fuente de proteínas seleccionada entre caballa, salmón, cangrejo verde y pescados blancos (en particular, bacalao, maruca, carbonero, faneca, juliana, pescadilla y merluza).

La invención se deduce así y en primer lugar de la demostración realizada por los inventores de que péptidos procedentes de animales marinos - en este caso, la caballa, el salmón, el cangrejo verde y los pescados blancos - poseen un efecto antioxidante capaz de mejorar la supervivencia de las células neuronales cuando están sometidas a un estrés oxidante.

Los inventores también prepararon, y analizaron su potencial neuroprotector, otros hidrolizados de proteínas animales de origen marino, procedentes de otras fuentes. Sin embargo, debido a una citotoxicidad relativamente elevada, no se seleccionó ninguno de ellos.

5 La invención resulta igualmente de la demostración por los inventores de que hidrolizados particulares, de acuerdo con la invención, presentan no sólo una actividad antioxidante neuroprotectora notable, sino también una actividad inhibidora de la prolil-endopeptidasa (PEP). Esta enzima, expresada en las zonas corticales del cerebro humano y en menor medida al nivel del cerebelo, interviene en el catabolismo de muchos de los neurotransmisores implicados en los procesos de la memoria y del aprendizaje. Estudios realizados en pacientes mayores afectados de enfermedades neurodegenerativas han permitido además poner de manifiesto una correlación entre la pérdida de memoria y un aumento anormal de la actividad de la PEP. Más recientemente, trabajos que han conducido a mejorar las funciones cognitivas de ratas convertidas en amnésicas, han confirmado así el creciente interés por los inhibidores de la PEP para el tratamiento preventivo y/o curativo de trastornos neurodegenerativos asociadas a la edad, principalmente para los que la pérdida de memoria y los trastornos cognitivos son sintomáticos. En este contexto, se consideran buenos candidatos ciertos hidrolizados de acuerdo con la invención, en particular los hidrolizados de proteínas de caballa y maruca.

Los hidrolizados de proteínas animales de origen marino con efectos neuroprotectores, de acuerdo con la invención, se pueden preparar de muchas maneras, a partir de caballa, salmón, cangrejo verde y/o pescados blancos (en particular, bacalao, maruca, carbonero, faneca, juliana, pescadilla y merluza). Principalmente, se pueden preparar por digestión enzimática, por medio de endopeptidasas y/o exopeptidasas, por ejemplo, papaína, subtilisina, aminopeptidasa, tripsina, quimotripsina... Eventualmente, la digestión enzimática está precedida por una etapa de trituración mecánica de la fuente proteica con la que se va a trabajar.

Más particularmente, la invención se refiere a hidrolizados de proteínas animales de origen marino preparados a partir de caballa, salmón, cangrejo verde y/o pescados blancos, y en los que el conjunto de péptidos presenta una distribución en peso molecular del siguiente perfil:

- 25 - más del 20% de la masa total de los péptidos corresponde a péptidos de peso molecular inferior a 300 Da,
- del 20 al 35% de la masa total de los péptidos corresponde a péptidos de peso molecular comprendido entre 300 y 500 Da,
- del 15 al 35% de la masa total de los péptidos corresponde a péptidos de peso molecular comprendido entre 500 y 1000 Da,
- 30 - menos del 15% de la masa total de los péptidos corresponde a péptidos de peso molecular superior a 1000 Da.

La invención se refiere a composiciones destinadas a ser administradas por vía oral, que comprenden un hidrolizado de proteínas animales de origen marino, tal como se ha descrito anteriormente. Dichas composiciones se utilizan/prescriben ventajosamente con el fin de reducir los factores de riesgo asociados al desarrollo de trastornos neurodegenerativos asociados al envejecimiento, de prevenir la aparición de estos trastornos y/o de ralentizar su desarrollo. Según la invención, estas composiciones pueden consistir en medicamentos, complementos alimenticios o nutracéuticos.

La invención se refiere también a los ingredientes, alimentos y/o productos farmacéuticos que comprenden un hidrolizado de proteínas animales de origen marino de acuerdo con la invención y destinados a ser utilizados para la preparación de estos medicamentos, estos complementos alimenticios y/o estos nutracéuticos.

Cualquiera que sea la forma en que se presenten (medicamento, complemento alimenticio, nutracéutico, ingrediente alimenticio), además de dicho hidrolizado de proteínas animales de origen marino, tal como se ha descrito anteriormente, presente en una cantidad neuroprotectora, las composiciones según la invención pueden comprender también al menos un aditivo y/o al menos un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico y/o alimentario, añadido(s) con el fin de obtener una forma galénica administrable por vía oral. Estos aditivos y/o excipientes son, por ejemplo, aglutinantes, lubricantes, edulcorantes, diluyentes, excipientes, agentes efervescentes, agentes de recubrimiento...

En particular, las composiciones de acuerdo con la invención pueden prepararse bajo diversas formas galénicas y formulaciones, principalmente:

- 50 - en forma de una mezcla de partículas sólidas y divididas, por ejemplo un polvo efervescente o no efervescente, que requiere para su ingestión que sea mezclada con agua,
- en forma de un comprimido efervescente o no, para ser tragado con un poco de agua, para ser chupado o para ser masticado,
- en forma de una solución, por ejemplo, una suspensión, un jarabe, una composición líquida que puede

estar introducida en una cápsula dura o blanda.

La presente invención se refiere además a la utilización de hidrolizados de proteínas animales de origen marino, tales como las descritas anteriormente, para la fabricación de un medicamento destinado a reducir los factores de riesgo asociados al desarrollo de trastornos neurodegenerativos vinculados al envejecimiento, a prevenir la aparición de estos trastornos y/o ralentizar su desarrollo.

La invención se refiere igualmente a hidrolizados de proteínas animales de origen marino preparados a partir de caballa, salmón, cangrejo verde y/o pescados blancos, así como a composiciones - del tipo complemento alimenticio, nutracéutico, medicamento o ingrediente - que comprende una cantidad neuroprotectora de dichos hidrolizados de proteínas animales de origen marino, caracterizadas, en combinación, por todas o algunas de las características mencionadas anteriormente o a continuación.

Otros objetos, características y ventajas de la invención aparecerán con la lectura de la descripción detallada siguiente y que presenta, por una parte, métodos particulares de preparación de diferentes hidrolizados de acuerdo con la invención y, por otra parte, ensayos que demuestran su efecto neuroprotector. Esta descripción detallada pretende ser ilustrativa y no limitativa.

Los resultados experimentales obtenidos se presentan principalmente en forma de representaciones gráficas adjuntas, entre las que:

- La Figura 1 es una representación en forma de histogramas, que muestran la inocuidad de los hidrolizados según la invención, analizados en células Neuro2A;
- La Figura 2 es una representación en forma de histogramas, que muestran el efecto antioxidante neuroprotector de los hidrolizados según la invención, analizados en células Neuro2A sometidas a estrés oxidante inducido por H₂O₂;
- La Figura 3 es una representación en forma de histogramas del poder inhibitorio ejercido por los hidrolizados según la invención sobre la prolil-endopeptidasa (PEP).

Ejemplo 1: Preparación de hidrolizados según la invención

1. Preparación de un hidrolizado de caballa

Caballas frescas y enteras se sometieron directamente a una hidrólisis enzimática con papaína. Para ello, las caballas se mezclaron con agua, en una proporción [pescado]/[agua] del orden de 2:1. La papaína se añadió a la mezcla, en una proporción del orden de 0,12% con relación al peso del pescado que se ha de tratar. El pH de la mezcla se ajustó a 5,8 ± 0,1 con ácido acético (80%) y su temperatura se mantuvo a 52°C. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo durante 4 horas con agitación y después 4 horas sin agitación.

La acción digestiva de la papaína se detuvo elevando la temperatura de la mezcla hasta aproximadamente 85°C. La mezcla se dejó en este estado durante un mínimo de 4 horas, sin agitación.

El hidrolizado de proteínas de caballa obtenido se filtró a continuación para eliminar las materias insolubles. La filtración se realizó en primer lugar sobre un tamiz giratorio (malla de 1 mm) y luego por medio de un filtro prensa. La fracción clarificada recuperada se pasteurizó a 95°C durante 1 hora, y luego se concentró a vacío.

2. Preparación de un hidrolizado de pulpa de salmón

Una vez separados los filetes, se recuperó (mecánicamente) la pulpa de las raspas centrales, se refinó y luego se congeló, con fines de conservación hasta la etapa de hidrólisis enzimática, realizada por acción de la papaína.

Después de triturarla, la pulpa se mezcló con agua, en una proporción [pescado]/[agua] del orden de 1:1. La mezcla se llevó hasta 55°C. Se añadió la papaína, en una proporción del orden del 0,05% con relación al peso de la pulpa que se ha de tratar.

La acción digestiva de la papaína se detuvo después de 3 horas, elevando la temperatura hasta aproximadamente 85°C. La mezcla se dejó en este estado, durante aproximadamente 120 minutos.

A continuación se filtró el hidrolizado de proteínas de salmón obtenido para eliminar las materias insolubles y los residuos de las raspas. La filtración se realizó en un tamiz rotatorio (malla de 1 mm). Una centrifugación permite perfeccionar la eliminación de las materias insolubles así como la eliminación de la materia grasa (fuerza centrifuga equivalente a un mínimo de 1000 g).

La fase acuosa recuperada se pasteurizó a 90°C, durante como máximo 120 a 180 minutos, después la temperatura se bajó hasta 80°C. El hidrolizado se concentra entonces a vacío.

3. Preparación de un hidrolizado de cangrejo verde

5 Cangrejos verdes enteros, congelados, se trituraron mecánicamente antes de ser sometidos a una hidrólisis enzimática con papaína. Para ello, el triturado de cangrejo se mezcló con agua, en una proporción [triturado]/[agua] del orden de 1:1. La papaína se añadió a la mezcla, en una proporción del orden del 0,05% con relación al peso de cangrejo que se ha de tratar. La mezcla se llevó hasta 58°C y se mantuvo a esta temperatura durante 3 horas.

La acción digestiva de la papaína se detuvo entonces elevando la temperatura de la mezcla, hasta aproximadamente 85°C. La mezcla se dejó en este estado, durante 90 minutos, con agitación.

10 Las materias insolubles de la mezcla se eliminaron por tamizado en un tamiz giratorio (malla de 1 mm) y luego el jugo recuperado se centrifugó con el fin de eliminar las materias solubles (fuerza centrífuga equivalente a un mínimo de 1000 g).

El líquido sobrenadante recuperado se pasteurizó a 95°C durante 2 a 3 horas y luego se concentró a vacío.

4. Preparación de un hidrolizado de fileteados de maruca

15 Los co-productos de fileteados frescos o congelados de pescados se sometieron a una hidrólisis enzimática, realizada por una acción combinada de papaína y alcalasa. Para este fin, los co-productos de fileteados, triturados o no, se mezclaron con agua, en una proporción [pescado]/[agua] del orden de 10:3. La mezcla se llevó hasta 55°C. Se añadió la papaína, en una proporción del orden del 0,06% con relación al peso del pescado que se ha de tratar. Durante la reacción de hidrólisis, el pH de la mezcla se ajustó a $5,9 \pm 0,1$, utilizando ácido fosfórico de calidad alimentaria (30%).

20 Después de 90 minutos de hidrólisis con papaína, se añadió alcalasa a la mezcla, en una proporción del orden del 0,2% con relación al peso de pescado. La reacción de hidrólisis enzimática total duró 8 horas.

La acción digestiva de la papaína y la alcalasa se detuvo aumentando la temperatura, hasta aproximadamente 85°C. La mezcla se dejó en este estado, durante 90 minutos.

25 El hidrolizado de proteínas de maruca obtenido se filtró a continuación para eliminar las materias insolubles. La filtración se realizó en primer lugar sobre un tamiz giratorio (malla de 1 mm) y luego a través de un tamiz de bolsillo (malla de la tela 1 mm). Una centrifugación permite perfeccionar la eliminación de las materias insolubles (fuerza centrífuga equivalente a un mínimo de 1000 g).

La fracción soluble recuperada se pasteurizó a 90°C, durante 90 minutos, y se reajustó el valor del pH hasta aproximadamente 4,8 con ayuda de ácido fosfórico de calidad alimentari (30%). Al final de la pasteurización, el producto se concentró a vacío.

30 5. Caracterización físico-química de los hidrolizados según la invención

Los hidrolizados de proteínas animales de origen marino, preparados anteriormente, se sometieron a un análisis físico-químico. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1

	Hidrolizado de caballa	Hidrolizado de salmón	Hidrolizado de cangrejo verde	Hidrolizado de maruca
pH al 10%	5,9	6,5	7,1	4,9
Extracto seco (%)	59,7	63,0	57,2	66,2
Proteínas/Extracto seco (%)	91,6	70,0	78,1	80,8
Grado de hidrólisis (%)	39,8	-	42,7	38,6
NaCl/Extracto seco (%)	3,6	19,3	17,7	
Minerales/Extracto seco (%)	<1	25,0	22,3	9,5
Lípidos/Extracto seco (%)	<1	<5		10,0

	Hidrolizado de caballa	Hidrolizado de salmón	Hidrolizado de cangrejo verde	Hidrolizado de maruca
Perfil peptídico (Da)				
PM > 7000	0,21%	5,54%	0,35%	0,15%
7000 > PM > 5000	0,07%	0,32%	0,15%	0,07%
5000 > PM > 3000	0,25%	0,53%	0,68%	0,27%
3000 > PM > 1000	5,39%	8,85%	4,32%	7,55%
1000 > PM > 500	25,28%	30,19%	16,02%	31,09%
500 > PM > 300	28,54%	29,66%	23,81%	31,72%
300 > PM	40,26%	24,94%	54,67%	29,15%
PM más representativo (Da)	321	384	263	349

Ejemplo 2: Evaluación del potencial neuroprotector de los hidrolizados según la invención

Se analizó cada uno de los cuatro hidrolizados descritos anteriormente para determinar su potencial neuroprotector.

1. Medición del efecto antioxidante de los hidrolizados según la invención, en células Neuro2A

- 5 El efecto antioxidante neuroprotector de los hidrolizados según la invención se evaluó por medio de células Neuro2A sometidas a un estrés oxidante inducido por H₂O₂ (300 µM).

1.1. Materiales y métodos

- Preparación y tratamiento de las células Neuro2A

- 10 Las células Neuro2A se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos y luego se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂ en el medio con 10% de suero. Después de una noche de cultivo, las células se lavaron con tampón PBS 1X y luego se pretrataron durante 2 horas con los productos de ensayo o el control positivo (Trolox, 10 µM), en un medio de cultivo desprovisto de suero. A continuación se indujo el estrés oxidante por la adición de H₂O₂ a una concentración final de 300 µM. Las células se incubaron así durante 24 horas.

- 15 Se evaluó entonces la supervivencia de las células Neuro2A, midiendo su actividad metabólica. Para ello, las células, previamente liberadas del medio de tratamiento, se incubaron durante 2 horas a 37°C y 5% de CO₂ con bromuro de MTT. Este compuesto fue transformado en MTT-formazán por las células metabólicamente activas. A continuación se disolvió el producto MTT-formazán en DMSO y luego se cuantificó por una lectura de la absorbancia a 570 nm.

- Preparación de los hidrolizados y los productos de ensayo

- 20 A partir de hidrolizados en bruto de ensayo almacenados a -18°C, se prepararon partes alícuotas y se conservaron a + 4°C. A partir de la parte alícuota conservada a + 4°C, cada producto de ensayo se diluyó en el medio de cultivo de células Neuro2A con el fin de obtener una concentración de 100 mg/mL.

Para los ensayos, se realizaron diluciones intermedias.

1.2. Evaluación de la inocuidad de los hidrolizados según la invención, en las células Neuro2A

- 25 Antes de la medición de su potencial antioxidante en las células Neuro2A, se analizaron los hidrolizados según la invención para determinar su inocuidad celular. La Figura 1 muestra los resultados obtenidos.

La digitonina a 60 µM, utilizada como control positivo de la toxicidad, indujo una disminución significativa (p < 0,001) en la viabilidad celular con relación al control. Este resultado valida el ensayo de citotoxicidad.

- 30 Trolox a 10 µM (control positivo de protección) así como los hidrolizados según la invención no muestran toxicidad; la viabilidad celular es próxima a la del control y es superior al 80%.

1.3. Evaluación del efecto antioxidante de los hidrolizados según la invención sobre las células Neuro2A

El efecto neuroprotector de los hidrolizados de ensayo se analizó en células Neuro2A sometidas a un estrés oxidante inducido por H₂O₂. La Figura 2 muestra esquemáticamente los resultados obtenidos en forma de histogramas. Resultados más detallados se recogen en la Tabla 2 siguiente.

5 La viabilidad del control inducida por H₂O₂ (300 µM) disminuyó significativamente alrededor de un 35% con relación al control no inducido, lo que valida la inducción del estrés oxidante sobre el conjunto de células Neuro2A. Trolox a 10 µM permite aumentar significativamente (p < 0,001) la viabilidad de las células Neuro2A que han sido sometidas a un estrés oxidante, lo que valida el ensayo (protección de aproximadamente 20%).

10 A la vista de los resultados obtenidos, se deduce que la protección de células frente al estrés oxidante es poco variable entre los hidrolizados ensayados:

- el efecto antioxidante neuroprotector del hidrolizado de caballa y de cangrejo verde aparece a la concentración de 0,3 µg/mL;
- el efecto antioxidante neuroprotector del hidrolizado de maruca es notable a la concentración de 3 µg/mL;
- el efecto antioxidante neuroprotector del hidrolizado de salmón es notable a la concentración de 3 µg/mL y es apreciable a 30 µM.

15

Tabla 2

Productos de ensayo	Dosis µg/mL	Citotoxicidad % de viabilidad (vs control)	Valor p (prueba t vs control)	Neuroprotección % de viabilidad (vs control + H ₂ O ₂)	Valor p (prueba t vs control + H ₂ O ₂)
Control		100% ± 7%	-	100% ± 6%	-
Control + H ₂ O ₂		-	-	66% ± 14%	-
Digitonina	60 µM	18% ± 3%	0,000	-	-
Trolox	10 µM	93% ± 12%	0,003	86% ± 9%	0,000
Hidrolizado de caballa	0,03	96% ± 5%	0,072	70% ± 9%	0,530
	0,3	95% ± 6%	0,053	76% ± 10%	0,067
Hidrolizado de cangrejo verde	0,03	92% ± 6%	0,000	76% ± 8%	0,040
	0,3	90% ± 7%	0,000	80% ± 8%	0,008
Hidrolizado de maruca	3	89% ± 10%	0,000	78% ± 10%	0,025
	30	92% ± 9%	0,003	77% ± 7%	0,032
Hidrolizado de salmón	3	95% ± 5%	0,023	75% ± 7%	0,056
	30	94% ± 6%	0,005	80% ± 10%	0,007

Ejemplo 3: Inhibición de la propil-endopeptidasa (PEP)

1. Materiales y métodos:

20 El ensayo enzimático sobre la PEP se realizó *in tubo*, en placa de 96 pocillos. La PEP y los productos de ensayo (hidrolizados, controles: bacitracina y Z-Pro-Prolinal) se diluyeron en el tampón de reacción a las concentraciones deseadas. Después de incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente, se añadió el sustrato (Z-Gly-Pro-pNA) a una concentración final de 160 µM. La reacción enzimática se inició entonces llevando la placa a 37°C.

La absorbancia de cada punto se midió a 410 nm de forma cinética a 37°C, cada 5 minutos durante 45 minutos. Se realizaron una medición con control sin inhibidor (sustrato + enzima) así como otra con control sin enzima. Con el fin de determinar la absorbancia de los productos de ensayo solos y para eliminar eventuales interferencias, se realizó una medición sin enzima para cada concentración.

5 *2. Análisis de los datos*

La inhibición de la PEP se midió después de 45 minutos. Los valores de absorbancia en este momento se utilizaron para calcular los porcentajes de inhibición de la PEP. Los datos obtenidos para los productos de ensayo se normalizaron con relación a los puntos sin enzima ("blanco") y luego se calcularon los porcentajes según la fórmula:

$$\frac{A \text{ del producto de ensayo} - A \text{ del control}}{A \text{ del control}} \times 100 = \text{porcentaje de inhibición de la PEP}$$

10 A del producto de ensayo: absorbancia normalizada de cada punto

A del control: valor medio de la absorbancia de los puntos de control (con enzima)

Se analizaron los hidrolizados de caballa y maruca, tales como se han descrito anteriormente, para determinar su aptitud para poder inhibir la PEP.

15 La Figura 3 presenta los resultados obtenidos, en forma de histogramas. Estos datos indican que los hidrolizados ensayados inhiben la PEP de forma significativa y dependiente de la dosis. A las dosis ensayadas, la inhibición puede alcanzar el 60%.

REIVINDICACIONES

1. Hidrolizado de proteínas animales de origen marino, procedente de al menos una fuente de proteínas elegidas entre caballa, salmón, cangrejo verde y pescados blancos, caracterizado porque el conjunto de péptidos de dicho hidrolizado presenta una distribución en peso molecular del siguiente perfil:

- 5 - más del 20% de la masa total de los péptidos corresponde a péptidos de peso molecular inferior a 300 Da,
- del 20 al 35% de la masa total de los péptidos corresponde a péptidos de peso molecular comprendido entre 300 y 500 Da,
- 10 - del 15 al 35% de la masa total de los péptidos corresponde a péptidos de peso molecular comprendido entre 500 y 1000 Da,
- menos del 15% de la masa total de los péptidos corresponde a péptidos de peso molecular superior a 1000 Da.

2. Hidrolizado según la reivindicación 1, procediendo dicho hidrolizado de un pescado blanco elegido entre: bacalao, maruca, carbonero, faneca, juliana, pescadilla y merluza.

15 3. Complemento alimenticio que comprende un hidrolizado de proteínas animales de origen marino según la reivindicación 1 o 2.

4. Nutracéutico que comprende un hidrolizado de proteínas animales de origen marino según la reivindicación 1 o 2.

5. Composición farmacéutica destinada a ser administrada por vía oral, que comprende un hidrolizado de proteínas animales de origen marino según la reivindicación 1 o 2.

20 6. Ingrediente que comprende un hidrolizado de proteínas animales de origen marino según la reivindicación 1 o 2.

7. Hidrolizado de proteínas animales de origen marino según la reivindicación 1 o 2, para su utilización como medicamento.

25 8. Utilización de un hidrolizado de proteínas animales de origen marino según la reivindicación 1 o 2, para la fabricación de un medicamento destinado a reducir los factores de riesgo asociados al desarrollo de trastornos neurodegenerativos vinculados al envejecimiento.

9. Utilización de un hidrolizado de proteínas animales de origen marino según la reivindicación 1 o 2, para la fabricación de un medicamento destinado a prevenir y/o ralentizar el desarrollo de un trastorno neurodegenerativo asociado al envejecimiento.

30 10. Utilización de un hidrolizado de proteínas animales de origen marino según la reivindicación 9, procediendo dicho hidrolizado de al menos una fuente de proteínas elegidas entre las de la caballa y la maruca.

FIGURA 1

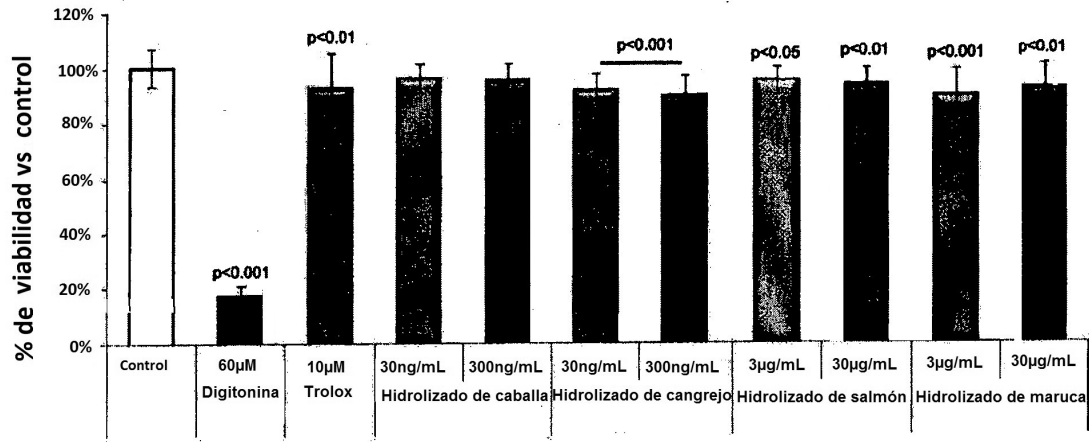


FIGURA 2

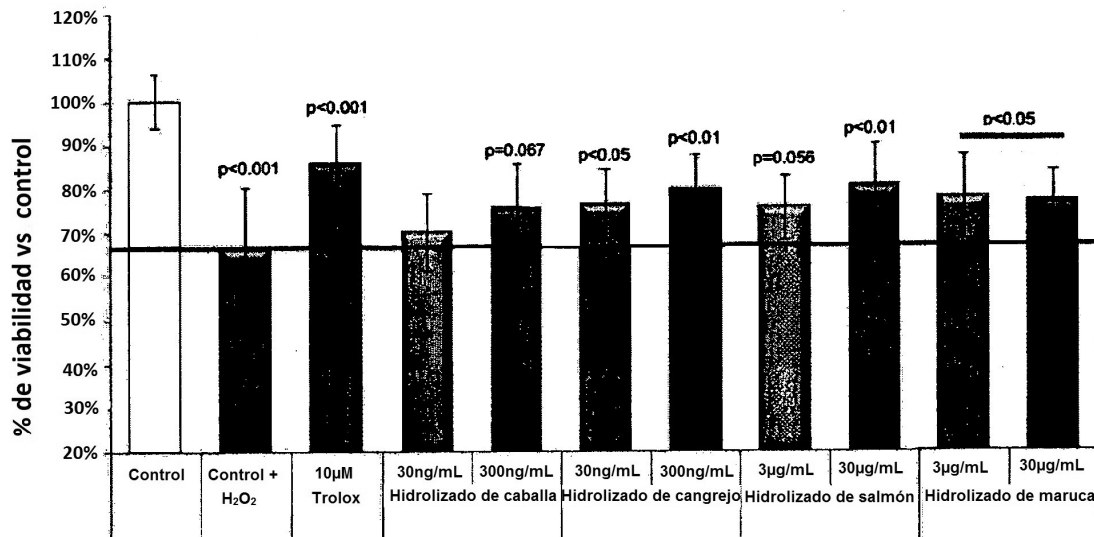


FIGURA 3

