

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 751**

51 Int. Cl.:

A23L 33/18 (2006.01)

A23L 33/155 (2006.01)

A23L 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2017** **PCT/EP2017/053891**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.08.2017** **WO17144443**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2017** **E 17706459 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020** **EP 3419439**

54 Título: **Composición para la prevención o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas**

30 Prioridad:

22.02.2016 EP 16156649

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

04.01.2021

73 Titular/es:

NEWTRICIOUS B.V. (100.0%)
Onderwijsboulevard 225
5223 DE 's Hertogenbosch, NL

72 Inventor/es:

JONKER, PAUL LEOPOLD;
VAN DER MADE, SANNE MARIA y
STERKMAN, LUCAS GERARDUS
WILLIBRORDUS

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 800 751 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

Composición para la prevención o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

Campo de la invención

5 La invención pertenece al campo de la prevención, alivio y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, en particular de demencia, que incluye la forma vascular de demencia y enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica. La invención proporciona nuevas composiciones que permiten una mejor prevención, alivio y tratamiento de tales enfermedades.

Antecedentes de la invención

10 Neurodegeneración es un término para una variedad de afecciones superpuestas que afectan principalmente a las neuronas en el cerebro humano. Estas afecciones son actualmente incurables y llevan a la pérdida progresiva de la estructura y/o función de las neuronas, que incluye la muerte de estas células. Son el resultado de una falla en la conectividad cerebral, que está formada por contactos neuronales-neuronales, neuronales-gliales y gliales-gliales. Las neuronas son los bloques de construcción del sistema nervioso, que incluye el cerebro y la médula espinal. Las neuronas no se reproducen ni reemplazan, por lo que cuando resultan dañadas o muertas, el cuerpo no puede reemplazarlas. Las enfermedades neurodegenerativas (ND) causan problemas con el movimiento (ataxia) o el funcionamiento mental (demencia). Los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas son la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y demencia, más comúnmente conocida como enfermedad de Alzheimer (AD). Las demencias son responsables de la mayor carga de enfermedad con Alzheimer que representa aproximadamente el 60-70% de los casos. En general, el riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa aumenta con el envejecimiento.

20 La WHO ha estimado que hay aproximadamente 35 millones de pacientes con AD en todo el mundo; se espera que estos números se dupliquen en 2030 y se tripliquen en 2050 (1), lo que hace que la AD sea la enfermedad neurodegenerativa más común. Además, el impacto de las enfermedades neurodegenerativas, tal como la AD, en la salud, la calidad de vida y los costos de atención médica muestra la importancia de hallar intervenciones preventivas que retrasen la progresión de las ND. Si es posible prevenir el deterioro cognitivo, en el caso de la AD, puede ser reducido el riesgo de enfermedades futuras y daños secundarios concomitantes en edades posteriores.

25 El proceso de neurodegeneración tiene varios aspectos, que no son bien comprendidos. Los ejemplos de estos aspectos son mutaciones genéticas, mal plegamiento de proteínas, degradación de proteínas y disfunción mitocondrial. Aunque la comprensión de las enfermedades neurodegenerativas ha avanzado notablemente en las últimas décadas, no existen medidas de tratamiento y prevención bien establecidas.

30 El documento WO2014/187942 describe el tratamiento o la prevención de trastornos neurodegenerativos usando mentol, linalool y/o icilina. Actualmente, son comercializados diversos medicamentos para el tratamiento de las ND. Es reivindicado que estos fármacos ayudan a retrasar o prevenir el empeoramiento de los síntomas, pero solo por un tiempo limitado. Además, pueden ayudar a controlar algunos síntomas de comportamiento. Sin embargo, estos fármacos presentan varios efectos secundarios tal como náuseas, vómitos, diarrea, calambres musculares, fatiga, pérdida de peso, mareos, disminución del apetito, constipación y cefalea. Esto muestra la clara necesidad de tratamientos que puedan intervenir con múltiples mecanismos del desarrollo de la neurodegeneración.

35 Existen diversos modelos animales disponibles para estudiar los mecanismos y las causas de las enfermedades neurodegenerativas. Estos modelos animales son ampliamente usados para estudiar la eficacia de los fármacos para el tratamiento y prevención de las enfermedades neurodegenerativas. Uno de los modelos más conocidos es la prueba de excavación, en la que es observado el comportamiento de los ratones para evaluar el daño o mal funcionamiento cerebral, así como la progresión de las enfermedades neurodegenerativas. La prueba aparenta ser particularmente útil para detectar signos tempranos de disfunción inicial y para el control de la progresión de enfermedades [30]. Ha sido demostrado que el modelo es sensible al daño del hipocampo y a la progresión de las enfermedades neurodegenerativas (2). En al menos un modelo de enfermedad de Alzheimer, los cambios neuropatológicos hallados, entre otros, en las regiones del hipocampo, pueden estar correlacionados con una reducción significativa en el rendimiento de excavación (3).

Sumario de la invención

40 Mediante el empleo de un modelo de ratón para enfermedades neurodegenerativas, ha sido descubierto que una composición, con preferencia una composición acuosa que comprende una xantófila en combinación con un hidrolizado de una proteína que comprende dipéptidos y tripéptidos, puede ser usada ventajosamente para tratar, prevenir o aliviar enfermedades neurodegenerativas.

Descripción detallada de la invención

55 Los resultados descritos en la presente memoria muestran que una composición que comprende una xantófila y un hidrolizado de una proteína, que comprende dipéptidos y tripéptidos, proporciona un efecto terapéutico sobre el

rendimiento de excavación cuando es administrada a un animal de prueba. La invención pertenece al objeto de las reivindicaciones.

Como se usa en la presente memoria, el término "una xantófila" abarca una o más especies de xantófilas y es equivalente al término "al menos una xantófila". Los ejemplos de xantófilas adecuadas son luteína y zeaxantina.

- 5 Como se usa en la presente memoria, el término "puede" abarca el término "podría", y el término "puede ser" abarca los términos "es" o "son", según el contexto. Además, es considerado que la presencia del término "puede" explica las opciones para practicar o implementar la divulgación, sin limitación.

- 10 Como se usa en la presente memoria, el término "un hidrolizado de una proteína que comprende dipéptidos y tripéptidos" se refiere a un hidrolizado de una proteína en el que el hidrolizado comprende una cierta cantidad de dipéptidos y tripéptidos derivados de la proteína como consecuencia de la hidrólisis.

Como se usa en la presente memoria, el término "hidrólisis" se refiere al proceso en el que una molécula de agua es añadida a una sustancia. Tal reacción es realizada preferentemente en presencia de una enzima.

- 15 La composición muestra un aumento pronunciado en el rendimiento de excavación de 2 horas de los ratones LDLr -/- Leiden, y ha sido descubierto que el efecto de la composición es sinérgico, es decir, mayor que la suma de los efectos de la xantófila y el hidrolizado por separado.

Existe amplia evidencia de que las xantófilas tienen un efecto beneficioso sobre los procesos inflamatorios en el cerebro (4), la piel (5), los ojos (6) y el hígado (7, 8). Las xantófilas pueden ser administradas convenientemente a un sujeto necesitado de dicho tratamiento.

- 20 En una realización preferente, la xantófila puede estar contenida en la yema de huevo. Cuando los pollos son alimentados con una dieta enriquecida con xantófilas, la yema contiene mayores cantidades de estas sustancias naturales, halladas en las micelas. Sin embargo, las cantidades de xantófilas que pueden ser administradas de forma segura están, por un lado, limitadas por la cantidad de xantófilas contenidas en la yema de huevo y, por otro lado, por la cantidad máxima de yema de huevo que puede ser administrada de forma segura a un sujeto. Con el fin de maximizar la cantidad de xantófilas que pueden ser administradas efectivamente en el torrente sanguíneo, han sido implementadas estrategias para maximizar la absorción de xantófilas en el intestino.

Anteriormente ha sido descrito que la absorción en el intestino puede mejorar mucho mediante la mezcla de la yema de huevo que contiene xantófilas con lípidos polares (21). Por ejemplo, ciertos productos lácteos son buenas fuentes de lípidos o fosfolípidos polares adecuados.

- 30 La yema de huevo puede ser formulada como una dispersión acuosa, tal como una dispersión láctea. La absorción en el intestino de xantófilas, tal como la luteína y zeaxantina, está muy aumentada en esta formulación (9, 10). Sin suscribir a teoría limitante alguna, es considerado que esta absorción aumentada es debida a la formación de micelas que están presentes en las mezclas (11).

- 35 Ha sido usada una dispersión acuosa que comprende productos lácteos, tal como suero de leche y yema de huevo que contiene luteína y zeaxantina, para tratar a sujetos con signos tempranos de degeneración macular relacionada con la edad, y que ha mostrado un efecto positivo sobre la agudeza visual (21).

Los hidrolizados de proteínas que contienen dipéptidos y tripéptidos también han sido usados para tratar enfermedades. Ha sido demostrado que un hidrolizado de proteína de salmón disminuye la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y MCP-1 en el arco aórtico de los ratones apoE-/- (12). La investigación in vitro mostró la capacidad de un hidrolizado de proteína de almendra para modular los niveles de IL-6, IL-1 β y TNF- α en macrófagos (13).

- 40 El documento EP 1685764 A1 describe el uso de un producto alimenticio que comprende un hidrolizado de proteínas seleccionado de ovomucina, lisozima y ovotransferrina para tratar la presión arterial alta.

- 45 En ratas Zucker obesas diabéticas, una dosis de 1-3 gramos por día de un hidrolizado de lisozima de clara de huevo mostró efectos sobre los marcadores inflamatorios (14). También ha sido demostrado que un hidrolizado de lisozima de clara de huevo redujo la expresión de ARNm de interleucina renal (IL) -1 β /IL-13, factor de necrosis tumoral renal (TNF)- α , expresión de ARNm y proteína P22phox y glomeruloesclerosis. La misma composición redujo adicionalmente la albuminuria y restauró la relajación aórtica dependiente del endotelio (EDR). La indometacina añadida al baño de órganos mejoró instantáneamente la EDR aórtica, lo que indica un papel para los prostanoideos contráctiles derivados de la ciclooxigenasa (COX) en la relajación opuesta en ratas ZDF. Este efecto de la indometacina es reducido mediante un hidrolizado de lisozima de clara de huevo, y coincide con una disminución de la expresión de la proteína renal COX-1/2. Por lo tanto, ha sido demostrado que los hidrolizados de proteínas que comprenden dipéptidos y tripéptidos tienen efectos antiinflamatorios. Los efectos sobre la neurodegeneración no han sido demostrados hasta la fecha.

En la actualidad ha sido descubierto que una composición que comprende una xantófila y un hidrolizado de una proteína que comprende dipéptidos y tripéptidos puede ser usada ventajosamente en el tratamiento, alivio o prevención de enfermedades neurodegenerativas.

- El hidrolizado que comprende dipéptidos y tripéptidos es obtenido preferentemente mediante la digestión de una proteína con una enzima hidrolizante. La proteína es seleccionada del grupo que consiste en lisozima, ovomucina, ovotransferrina, ovoalbúmina y caseína. La enzima hidrolizante es preferentemente una endopeptidasa, tal como una serina proteasa. En una realización particularmente ventajosa, la serina proteasa es una subtilasa, preferentemente subtilisina, más preferentemente Alcalase™.
- La composición de acuerdo con la invención puede comprender además un compuesto farmacológicamente activo o nutricionalmente beneficioso adicional, tal como un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un ácido graso omega-3, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, uridina, vitamina D, ácido fólico, vitamina E, xantófilas, yodo, selenio y cinc. En una realización, la composición de acuerdo con la invención es una composición acuosa.
- Es particularmente preferente que el contenido de dipéptidos y tripéptidos sea superior a 5% del contenido de proteína total de la composición de acuerdo con la invención. En una realización preferente, los di y tri-péptidos pueden constituir al menos 10% del contenido de proteína total de la composición.
- Es aún más preferente que al menos 30%, tal como 40% o 45%, tal como al menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o incluso al menos 98% de los péptidos en la composición, tal como la composición acuosa, tengan un peso molecular menor que 500 Da. Esta fracción contiene los dipéptidos y tripéptidos.
- Hay una gran cantidad de procedimientos disponibles para determinar el contenido total de proteínas en un producto alimenticio. La persona experta conoce bien los pros y los contras de cada uno de estos procedimientos y podrá elegir un procedimiento adecuado de acuerdo con la elección del producto alimenticio. Solo a modo de ejemplo, el bien conocido procedimiento Kjeldahl puede ser usado con ovoalbúmina como estándar.
- La composición de acuerdo con la invención puede ser una solución lista para uso, como una solución madre a partir de la cual puede ser obtenida o preparada la dosis diaria por dilución o puede ser una composición seca de la que puede ser obtenida una dosis diaria mediante la adición de un líquido. La composición también puede ser usada como materia seca y mezclada con un alimento. Los expertos en la técnica conocen bien estas y otras formas de administrar una composición a un individuo necesitado de dicho tratamiento.
- El contenido de dipéptidos y tripéptidos también puede ser expresado como un porcentaje del contenido de proteína total de la composición. Por lo tanto, la composición de acuerdo con la invención también puede ser caracterizada por el intervalo de que al menos el 30% de los péptidos en el hidrolizado que comprende dipéptidos y tripéptidos tienen un peso molecular menor que 0,5 kD.
- En una realización preferente, la composición comprende al menos 10 gramos de dipéptidos y tripéptidos por kg de composición, tal como al menos 20, 40, 60, 80 o 100 gramos por kg de composición. En una realización preferente adicional, la composición comprende al menos 200, 400, 800 o son añadidos hasta 1000 gramos de dipéptidos y tripéptidos por kg de composición.
- Una dosis diaria adecuada de la composición para un ser humano está entre 5 y 250 gramos, preferentemente entre 10 y 200 gramos, tal como entre 20 y 100 gramos, tal como 25 gramos o 50 gramos. Los expertos en la técnica conocen bien la dosis diaria recomendada adecuada para otros sujetos, tales como animales no humanos.
- Una dosis diaria preferentemente debe contener aproximadamente al menos 500 mg de dipéptidos y tripéptidos, tales como al menos 1000 mg, 2000 mg o 5000 mg (Tabla 1).

Tabla 1: Composiciones preferentes de acuerdo con la invención

Ingrediente:	Lista para uso preferente [mg/kg de composición]	Dosis diaria recomendada [mg]	Conc. mínima preferente [mg/kg de composición]	Conc. máxima preferente [mg/kg de composición]
Lípidos polares lácteos	500	12	20	10000
Xantófilas	50	1	5	500
Ácido graso omega-3	9000	200	1000	50000
Dipéptidos y tripéptidos	100000	2000	10000	900000

La xantófila puede estar contenida en una solución acuosa o no acuosa o en forma seca. Sin embargo, es preferente que la xantófila esté contenida en una dispersión acuosa. Tal dispersión está contenida en el término "composición acuosa" y puede ser seleccionada del grupo que consiste en leche desnatada, leche semidesnatada, suero de leche, una fracción de suero de leche, leche fermentada, yogur, bebida de soja, leche de soja, leche de soja fermentada, zumos de frutas, purés de frutas, jarabes, zumos de verduras y purés de verduras. Preferentemente, la dispersión acuosa es suero de leche o una fracción de suero de leche.

En una realización preferente, una composición de acuerdo con la invención comprende al menos 20 mg de lípidos polares lácteos por kg de composición, tal como al menos 40, 60, 80 o 100 mg/kg. En una realización preferente, la composición comprende al menos 200 mg de lípidos polares lácteos, tales como 300, 400, 500, 600, 700, 800 o 900 mg por kg de composición. Si bien apenas existe un límite superior para el contenido de lípidos polares lácteos de la composición, a efectos prácticos, el contenido de lípidos polares lácteos puede ser mantenido por debajo de 10000 mg por kg de la composición.

Es preferente un contenido de xantófila de al menos 2 mg por kg de composición, preferentemente la composición comprende al menos 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 30 o incluso al menos 50 mg por kg. Las xantófilas preferentes son luteína y zeaxantina. En una realización preferente adicional, la composición comprende al menos 10 mg luteína por kg de composición, tal como 12, 14, 16, 18 o al menos 20 mg per kg, tal como 25, 30, 35 o al menos 40 mg per kg.

En una realización preferente adicional, la invención se refiere a una composición que comprende al menos 1000 mg de ácidos grasos omega-3 tal como DHA por kg de composición, tal como al menos 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o incluso 10000 mg por kg de composición o más. Aunque no existe un máximo para el contenido de DHA de la composición, a efectos prácticos, la composición no puede contener más de 50000 mg de DHA por kg de composición.

Una dosis diaria preferente del ácido graso omega-3 es de aproximadamente 50 mg, tal como 100 mg, tal como 150 mg, 200, 400 o 500 mg.

Cabe señalar que el término "suero de leche" como se usa en la presente memoria se refiere a un producto lácteo obtenido en una fermentación de un producto lácteo, tal como leche entera. El uso de lo que puede ser denominado "suero de leche sintético", tal como leche con bajo contenido graso acidificada o leche sin grasa es menos preferente, aunque a menudo los fabricantes de lácteos la etiquetan como suero de leche. El proceso de fermentación enriquece el suero de leche con los lípidos polares deseables, que están presentes solo en niveles bajos o totalmente ausentes en los productos de suero de leche sintético. En general, los productos lácteos, tales como el suero de leche, que contienen al menos 80 mg de lípidos polares por litro son adecuados para usar en la fabricación de la composición de la presente invención. Es preferente el uso de productos lácteos con un contenido de lípidos polares lácteos aún mayor, tal como al menos 100 mg por litro, como 120, 140, 180, 220, 260, 300, 340, 380 o incluso al menos 420 mg por litro.

La xantófila es seleccionada preferentemente del grupo que consiste en zeaxantina, luteína y meso-zeaxantina y puede estar comprendida en la yema de huevo. Por lo tanto, la composición de acuerdo con la invención puede comprender yema de huevo o una fracción de yema de huevo que contiene el componente de xantófila de la yema de huevo.

Es particularmente preferente que la yema de huevo y la dispersión acuosa estén presentes en una relación en peso entre 1: 2 a 1: 7, se prefieren particularmente las relaciones entre 1: 2 y 1: 3.

Las composiciones como son descritas en la presente memoria también pueden estar en forma concentrada,

deshidratada o seca, obtenibles mediante la deshidratación de las composiciones acuosas como se describe en la presente memoria.

- La composición de acuerdo con la invención puede ser empleada ventajosamente como un producto alimenticio, como un suplemento alimenticio o como un medicamento para el tratamiento de una enfermedad. Debe ser usada en el tratamiento, prevención o alivio de una enfermedad neurodegenerativa, seleccionada del grupo que consiste en demencia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica.

Ejemplos

Ejemplo 1: producción de una composición que comprende una xantófila

- Una composición que comprende una xantófila es producida a partir de huevos obtenidos mediante la alimentación con luteína y zeaxantina a pollos y la recolección de las yemas de los huevos producidos por estos pollos (documento WO 2009/078716). Estos huevos son denominados huevos enriquecidos en la presente memoria.

- Los alimentos para producir los huevos enriquecidos son formulados y producidos dentro de los requerimientos legales para la alimentación animal. El uso de luteína y zeaxantina está regulado por la regulación de EU 1831/2003. La dosificación de luteína y zeaxantina en el alimento no excede el límite legal de 80 ppm en el alimento para animales.

Los huevos enriquecidos producidos por aves de corral que fueron alimentadas con alimento enriquecido con luteína y zeaxantina contienen 45 - 80 mg de luteína por kg de yema de huevo y 10-30 mg de zeaxantina por kg de yema de huevo.

- Los animales también fueron alimentados con una dieta rica en ácidos grasos omega-3; los huevos contienen aproximadamente 200 mg de ácidos grasos omega-3 por kg de yema de huevo, con una desviación estándar de 10 mg.

Ejemplo 2: Fabricación de una dispersión acuosa que comprende xantófilas

- Los huevos enriquecidos con xantófilas y DHA son producidos bajo un esquema de calidad certificado ISO 22000/HACCP como es descrito en el ejemplo 1. Los huevos son separados en yema y albúmina en una instalación automatizada en una planta certificada ISO 22000: 2005. La yema de huevo de 165000 huevos enriquecidos es mezclada (15 min., 4 °C) con 5500 litros de suero de leche que contiene 80 mg de lípidos polares por litro y 170 kg de azúcar. El líquido es pasteurizado durante 3 minutos a 65 °C y enfriado a 4 °C. Esta composición es denominada en la presente memoria formulación líquida NWT-02 o NWT-02.

- Para el almacenamiento, la composición es secada hasta un polvo con un contenido de humedad de 4 (± 1)% y es mezclada con un agente de flujo libre (SiO₂, Sipernat 22S).

Ejemplo 3: Preparación de un hidrolizado de proteína que comprende dipéptidos y tripéptidos

- Una solución 5% (p/v) de lisozima en agua (contenido de proteína 100%, Belovo SA, Bastogne, Bélgica) es preparada y ajustada a un pH entre 7,5 y 8,5 con KOH 3 M. La hidrólisis es iniciada mediante la adición de Alcalase (T^m) (Novozymes) a una concentración final de 4% en forma de proteína. La solución es incubada durante un total de 5-6 horas a 60 °C, bajo agitación continua. Alcalase es inactivado después mediante el aumento de la temperatura a 90 °C durante 15 minutos. La solución es enfriada después a 2 °C y almacenada durante la noche bajo agitación continua.

- La solución de hidrolizado resultante es filtrada a través de un filtro de 10 µm y después a través de un filtro de 1 µm. Después, el filtrado es tratado térmicamente durante 15 segundos a 135 °C y concentrado hasta una materia seca de 57° Brix (aproximadamente materia seca de 45%) mediante un evaporador NIRO con un flujo de 3300L/ha 90 °C. Después de la evaporación, el producto es secado por pulverización para obtener un polvo con muy buenas propiedades de fluidez, como lo demuestra la observación visual.

El producto final tiene las siguientes características: polvo blanco, buena solubilidad, grado de hidrólisis de 21% (15) y un peso molecular máximo menor que 10 kDa. La distribución del tamaño del péptido es la siguiente: 46% <500 Da, 23% 500-1000 Da, 32% > 1000 Da. Este producto también es denominado en la presente memoria como NWT-03.

Ejemplo 4: Preparación de hidrolizados de proteína alternativos

La ovomucina, ovotransferrina, ovoalbúmina y caseína son hidrolizadas cada una individualmente mediante una mezcla de cuatro proteasas diferentes disponibles comercialmente (mezclas de proteasas, Newlase F, Promod 278P, Alcalase y Umamizyme).

- Las proteínas son disueltas en agua e incubadas con la mezcla enzimática de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las enzimas después son inactivadas mediante el aumento de la temperatura a 90 °C durante 15 minutos. La solución es enfriada después a 2 °C y almacenada durante la noche bajo agitación continua.

La solución de hidrolizado es filtrada a través de un filtro de 10 µm y después a través de un filtro de 1 µm. Después, el filtrado es tratado térmicamente durante 15 segundos a 135 °C y concentrado hasta una materia seca de 57° Brix mediante un evaporador de NIRO a un flujo de 3300L/ha 90 °C. Después de la evaporación, el producto es secado por pulverización para obtener un polvo con muy buenas propiedades de fluidez, como lo demuestra la observación visual.

El producto final tiene las siguientes características: polvo blanco, buena solubilidad, grado de hidrólisis de 24% y un peso molecular máximo menor que 10 kDa. La distribución del tamaño del péptido es la siguiente: 98% <500 Da, 1% 500-1000 Da, 1% > 1000 Da.

Ejemplo 5: Preparación de NWT-02 para dietas de ratón

Es alimentado NWT-02 a los ratones como una mezcla a través de una dieta rica en grasas, que comprende 59 g de NWT02/kg de dieta rica en grasas que contiene 24% (p/p) de manteca de cerdo (Research Diets, D12541, USA). Esto equivale a una ingesta de 0,16 g de NWT-02/ratón/día, lo que equivale a una ingesta entre 7 y 9 microgramos de luteína/ratón/día.

Ejemplo 6: Preparación de NWT-03 para dietas de ratones

Es alimentado NWT-03 a los ratones como una mezcla a través de una dieta rica en grasas, que comprende 35,7 g de NWT03/kg de dieta rica en grasas que contiene 24% (p/p) de manteca de cerdo (Research Diets, D12541, USA). Esto equivale a una ingesta de 0,1 g de NWT03/ratón/día.

Ejemplo 7: Preparación de NWT-02 y NWT-03 en dietas de ratones

Es alimentado NWT-02 más NWT-03 a los ratones como una mezcla a través de una dieta rica en grasas, que comprende 59 g de NWT02/kg de dieta rica en grasas y 35,7 g de NWT03/kg de dieta rica en grasas que contiene 24% (p/p) de manteca de cerdo (Research Diets, D12541, USA). Esto equivale a una ingesta de 0,16 g NWT-02 más 0,1 g NWT-03/ratón/día.

Ejemplo 8: Experimentos en animales in vivo

El estudio es realizado con 48 ratones macho ratones LDLr -/- Leiden de aproximadamente 12 semanas de edad. Los ratones son alimentados con una dieta rica en grasas (HFD) que contiene 24% de manteca de cerdo, como es descrito y usado anteriormente (16) con o sin las preparaciones de NWT-02 y/o NWT-03 como es descrito anteriormente. Todos los ratones fueron alimentados con HFD de t = 0 a t = 9 semanas. Los ratones son combinados en t = 9 semanas en 4 grupos de 12 ratones en función del peso corporal y los niveles de glucosa en plasma. Los grupos formados son:

1) HFD control (n=12)

2) HFD + NWT-02 (n=12)

3) HFD + NWT-03 (n=12)

4) HFD + NWT-02 +NWT-03 (n=12)

Ejemplo 9: Pruebas funcionales

En t = 9 y t = 21 semanas, los ratones son examinados en una prueba de excavación de la siguiente manera (de acuerdo con Deacon, J Vis Exp. 2012 Jan 5; (59):e2607).

Los ratones han sido habituados al procedimiento una semana antes de la prueba mediante la colocación del tubo de excavación en la jaula. Después de dos mediciones de referencia (durante la noche, 48 h de diferencia), es realizada la prueba de excavación. El ratón es colocado en una jaula con el tubo de excavación que contiene 200 g de gránulos de comida. El tubo es pesado después de 2 horas.

Es determinada la diferencia entre el comportamiento de excavación al inicio (t = 9 semanas) y el final (t = 21 semanas) del tratamiento. Ha sido hallado que los ratones alimentados con una dieta rica en grasas (grupo 1) y aquellos alimentados con una dieta alta en grasas en combinación con NWT-02 excavaron sustancialmente la misma cantidad de material (-2,1 gramos y -2,5 gramos respectivamente) al principio y al final de la prueba (Figura 1).

Los ratones alimentados con una dieta rica en grasas que contiene NWT-03 excavaron 12,7 gramos en promedio, mientras que los ratones alimentados con una dieta rica en grasas que comprende NWT-02 y NWT-03 excavaron 25,2 gramos en promedio.

Se ha arribado a la conclusión de que NWT-03 tiene un efecto positivo sobre la cognición y puede ser usado para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Este efecto es potenciado sinérgicamente mediante la adición de NWT-02.

Ejemplo 10: prueba de preparaciones equivalentes de NWT03

Las pruebas funcionales descritas en el ejemplo 9 son repetidas con fuentes alternativas de dipéptidos y tripéptidos obtenidos por digestión enzimática de ovomucina, ovotransferrina, ovoalbúmina y caseína, como es descrito en el ejemplo 4. La diferencia observada en el comportamiento de excavación es marginal; todas las preparaciones analizadas muestran que los hidrolizados de proteínas tienen un efecto positivo sobre la cognición y, por lo tanto, pueden ser usadas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Este efecto es nuevamente potenciado sinérgicamente por la adición de NWT-02.

Referencias

1. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74. PubMed PMID: 12490960.
2. Telander DG. Inflammation and age-related macular degeneration (AMD). *Seminars in ophthalmology*. 2011 20 May;26(3):192-7. PubMed PMID: 21609232.
3. Wyss-Coray T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nature medicine*. 2006 Sep;12(9):1005-15. PubMed PMID: 16960575.
4. Sullivan F. Smart Prevention - Health Care Cost Savings Resulting from the Targeted Use of Dietary Supplements. 2013.
5. Nolan JM. Personal communication. Waterford University; 2013.
6. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004 Jun;89(6):2548-56. PubMed PMID: 15181022.
7. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000 Sep;85(9):3338-42. PubMed PMID: 10999830.
8. Mohamed-Ali V, Flower L, Sethi J, Hotamisligil G, Gray R, Humphries SE, et al. beta-Adrenergic regulation of IL-6 release from adipose tissue: in vivo and in vitro studies. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001 Dec;86(12):5864-9. PubMed PMID: 11739453.
9. Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1998 Jan;12(1):57-65. PubMed PMID: 9438411.
10. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation*. 2002 Oct 15;106(16):2067-72. PubMed PMID: 12379575.
11. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of applied physiology*. 2005 Apr;98(4):1154-62. PubMed PMID: 15772055.
12. Rogowski O, Shapira I, Bassat OK, Chundadze T, Finn T, Berliner S, et al. Waist circumference as the predominant contributor to the micro-inflammatory response in the metabolic syndrome: a cross sectional study. *Journal of inflammation*. 2010;7:35. PubMed PMID: 20659330. Pubmed Central PMCID: 2919526.
13. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Bulmer K, Holly JM, Yudkin JS, Coppack SW. Production of soluble tumor necrosis factor receptors by human subcutaneous adipose tissue in vivo. *The American journal of physiology*. 1999 Dec;277(6 Pt 1):E971-5. PubMed PMID: 10600783.
14. Clement K, Viguerie N, Poitou C, Carette C, Pelloux V, Curat CA, et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004 Nov;18(14):1657-69. PubMed PMID: 15522911.
15. Stitzinger M. Lipids, inflammation and atherosclerosis. Leiden: Leiden/Amsterdam Center for Drug Research; 2007.
16. Li SY, Yang D, Fu ZJ, Woo T, Wong D, Lo AC. Lutein enhances survival and reduces neuronal damage in a mouse model of ischemic stroke. *Neurobiology of disease*. 2012 Jan;45(1):624-32. PubMed PMID: 22024715.
17. Evans JA, Johnson EJ. The role of phytonutrients in skin health. *Nutrients*. 2010 Aug;2(8):903-28. PubMed PMID: 22254062. Pubmed Central PMCID: 3257702.
18. Kijlstra A, Tian Y, Kelly ER, Berendschot TT. Lutein: more than just a filter for blue light. *Progress in retinal*

and eye research. 2012 Jul;31(4):303-15. PubMed PMID: 22465791.

19. Kim JE, Clark RM, Park Y, Lee J, Fernandez ML. Lutein decreases oxidative stress and inflammation in liver and eyes of guinea pigs fed a hypercholesterolemic diet. *Nutrition research and practice*. 2012 Apr;6(2):113-9. PubMed PMID: 22586499. Pubmed Central PMCID: 3349032.

5 20. Meriwether LS, Humphrey BD, Peterson DG, Klasing KC, Koutsos EA. Lutein exposure, in ovo or in the diet, reduces parameters of inflammation in the liver and spleen laying-type chicks (*Gallus gallus domesticus*). *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 2010 Oct;94(5):e115-22. PubMed PMID: 20546071.

21. WO2009/078716; Thielen WJG, Berendschot TTJM, Nelissen JWPM, Plat J, inventors. Method of producing egg yolk based functional food product and products obtainable thereby.

10 22. Chung HY, Rasmussen HM, Johnson EJ. Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *The Journal of nutrition*. 2004 Aug;134(8):1887-93. PubMed PMID: 15284371.

23. Kelly ER, Plat J, Haenen GR, Kijlstra A, Berendschot TT. The effect of modified eggs and an egg-yolk based beverage on serum lutein and zeaxanthin concentrations and macular pigment optical density: results from a randomized trial. *PloS one*. 2014;9(3):e92659. PubMed PMID: 24675775. Pubmed Central PMCID: 3968018.

15 24. Abdel-Aal el SM, Akhtar H, Zaheer K, Ali R. Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. *Nutrients*. 2013 Apr;5(4):1169-85. PubMed PMID: 23571649. Pubmed Central PMCID: 3705341.

20 25. Parolini C, Vik R, Busnelli M, Bjorndal B, Holm S, Brattelid T, et al. A salmon protein hydrolysate exerts lipid-independent anti-atherosclerotic activity in ApoE-deficient mice. *PloS one*. 2014;9(5):e97598. PubMed PMID: 24840793. Pubmed Central PMCID: 4026378.

26. Udenigwe CC, Je JY, Cho YS, Yada RY. Almond protein hydrolysate fraction modulates the expression of proinflammatory cytokines and enzymes in activated macrophages. *Food & function*. 2013 Apr 30;4(5):777-83. PubMed PMID: 23575976.

25 27. Wang Y, Landheer S, van Gilst WH, van Amerongen A, Hammes HP, Henning RH, et al. Attenuation of renovascular damage in Zucker diabetic fatty rat by NWT-03, an egg protein hydrolysate with ACE- and DPP4-inhibitory Activity. *PloS one*. 2012;7(10):e46781. PubMed PMID: 23071636. Pubmed Central PMCID: 3468629.

28. Radonjic M, Wielinga PY, Wopereis S, Kelder T, Goelela VS, Verschuren L, et al. Differential effects of drug interventions and dietary lifestyle in developing type 2 diabetes and complications: a systems biology analysis in LDLr^{-/-} mice. *PloS one*. 2013;8(2):e56122. PubMed PMID: 23457508. Pubmed Central PMCID: 3574110.

30 29. van der Made SM, Kelly ER, Berendschot TT, Kijlstra A, Lutjohann D, Plat J. Consuming a Buttermilk Drink Containing Lutein-Enriched Egg Yolk Daily for 1 Year Increased Plasma Lutein but Did Not Affect Serum Lipid or Lipoprotein Concentrations in Adults with Early Signs of Age-Related Macular Degeneration. *The Journal of nutrition*. 2014 Jul 2. PubMed PMID: 24991045.

35 30. Jirkof, P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *J. Neuroscience Methods* 234 (2014) 139-146.

REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa que comprende:
 - a. al menos una xantófila y
 - b. un hidrolizado de una proteína, que comprende dipéptidos y tripéptidos
- 5 para uso en el tratamiento, prevención o alivio de una enfermedad neurodegenerativa, en la que la enfermedad neurodegenerativa es seleccionada del grupo que consiste en demencia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica, en la que la proteína es seleccionada del grupo que consiste en lisozima, ovomucina, ovotransferrina, ovoalbúmina y caseína.
- 10 2. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el hidrolizado puede ser obtenido por el tratamiento de la proteína con una enzima.
3. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la enzima es una endopeptidasa.
4. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 2 en la que la enzima es seleccionada del grupo de enzimas que consiste en una serina proteasa, subtilasa, subtilisina, y Alcalase™.
- 15 5. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en la que la composición además comprende un compuesto farmacológicamente activo seleccionado del grupo que consiste en un ácido graso omega-3, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, vitamina D, uridina, ácido fólico, vitamina E, yodo, selenio y cinc.
- 20 6. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5 en la que los dipéptidos y tripéptidos constituyen al menos 10% del contenido de proteína total de la composición.
7. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 en la que los dipéptidos y tripéptidos tienen un peso molecular menor que 0,5 kD.
8. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7 en la que el al menos una xantófila está contenida en una dispersión acuosa.
- 25 9. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 8 en la que la dispersión acuosa es seleccionada del grupo que consiste en leche desnatada, leche semidesnatada, suero de leche, una fracción de suero de leche, leche fermentada, yogur, bebida de soja, leche de soja, leche de soja fermentada, zumos de frutas, purés de frutas, jarabes, zumos de verduras y purés de verduras.
- 30 10. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 9 en la que la dispersión acuosa es suero de leche o una fracción de suero de leche.
11. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10 en la que el al menos una xantófila es seleccionada del grupo que consiste en zeaxantina, luteína y meso-zeaxantina.
12. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11 que además comprende yema de huevo.
- 35 13. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 12 en la que la yema de huevo y la dispersión acuosa están presentes en una relación de peso entre 1:2 y 1:7, con preferencia entre 1:2 y 1:3.
14. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13 en la que la composición acuosa está deshidratada.
- 40 15. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 14 en la que la composición acuosa está contenida en un producto alimenticio.

Figura 1

