

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 661**

51 Int. Cl.:

A23K 20/147 (2006.01)
A23J 3/34 (2006.01)
A23K 50/40 (2006.01)
A23L 33/18 (2006.01)
A61K 38/01 (2006.01)
A23L 33/115 (2006.01)
A23L 33/12 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01)
A23J 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2020** **PCT/EP2020/071717**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2021** **WO21019093**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2020** **E 20746238 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2023** **EP 4007499**

54 Título: **Hidrolizado de proteínas de pescado azul**

30 Prioridad:

01.08.2019 FR 1908837

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.07.2024

73 Titular/es:

SPÉCIALITÉS PET FOOD (11.1%)
Z. A. du Gohélis
56250 Elven, FR;
UNIVERSITE DE BORDEAUX (11.1%);
UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE (11.1%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (11.1%);
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE
DÉVELOPPEMENT (IRD) (11.1%);
INSTITUT POLYTECHNIQUE DE BORDEAUX (11.1%);
ABYSS INGREDIENTS (11.1%);
INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE POUR
L'EXPLOITATION DE LA MER (IFREMER) (11.1%) y
INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR
L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET
L'ENVIRONNEMENT (11.1%)

72 Inventor/es:

GUERARD, FABIENNE;
OROY, CLOÉ;
LEPOUDERE, ANNE;
CHATAIGNER, MATHILDE;
ALLAUME, PATRICK;
DINEL, ANNE-LAURE;
JOFFRE, CORINNE;
PALLET, VÉRONIQUE y
LE GRAND, FABIENNE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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).

ES 2 974 661 T3

DESCRIPCIÓN

Hidrolizado de proteínas de pescado azul

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a hidrolizados de proteínas funcionales. Más concretamente, se trata de un hidrolizado de proteínas obtenido a partir de al menos una fuente de proteínas de pescado azul que comprende (i) un grado de hidrólisis (GH) de al menos un 10 %, (ii) al menos un 80 % de proteínas solubles en agua de peso molecular de menos de 1000 Da, (iii) al menos un 0.3 % de fosfolípidos, y (iv) al menos un 0.5 % de DHA y EPA. Se relaciona además con composiciones alimenticias o farmacéuticas que comprenden dicho hidrolizado de proteínas y su utilización para la prevención y/o el tratamiento de trastornos cognitivos leves relacionados con la edad.

10 **Estado de la técnica**

El envejecimiento de la población constituye uno de los mayores retos económicos y sociales del siglo XXI (1). Para 2040, se espera que la cantidad de personas en el mundo mayores de 65 años se duplique con creces, pasando de 506 millones en 2008 a 1300 millones, de acuerdo con un estudio estadounidense de 2009 (2). Para 2025, más de 148 millones de personas en Europa tendrán más de 65 años (>20 % de la población) en comparación con los 120 millones de 2010, con un aumento particularmente rápido en el número de octogenarios. El envejecimiento se acompaña en el ser humano de la aparición de síntomas específicos, especialmente, el deterioro cognitivo relacionado con el envejecimiento cerebral (3). Se trata de una alteración no patológica, pero significativa de las funciones cerebrales, incluidos especialmente los trastornos de la memoria y la vigilancia, que puede conducir a una pérdida de autonomía y, en ocasiones, puede presagiar enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, encontrar soluciones que permitan a las personas envejecer con buena salud durante el mayor tiempo posible es esencial y constituye un verdadero desafío económico, social y de salud pública para los países desarrollados. El concepto de «envejecimiento saludable» (4) o «envejecimiento exitoso» integra estos diferentes aspectos y la era de la medicina 4P (más preventiva, predictiva, personalizada, participativa) en la que nos adentramos debería, en los próximos años, dar un lugar privilegiado a la prevención, especialmente, a través de la nutrición, y a que cada individuo se responsabilice de su propia salud.

25 De manera similar, la esperanza de vida de las mascotas, especialmente gatos y perros, aumenta constantemente debido a la mejora de la nutrición y el cuidado. En los Estados Unidos, por ejemplo, el promedio de vida de los perros era de 11 años en 2012 (+0.5 años frente a 2002), mientras que para los gatos era de 12 años en el mismo año (+1 año frente a 2002) (5). En los Estados Unidos, se estima que el (30-40) % de la población total de perros tiene más de 7 años. En Europa, la estimación menos precisa sitúa esta proporción en un (25-45) %.

30 Al igual que con los seres humanos, la creciente esperanza de vida de las mascotas plantea desafíos reales para mantener condiciones de vida satisfactorias para las personas mayores. Uno de los principales desafíos es reducir la incidencia de las enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad, o al menos retrasarlas. Entre estas enfermedades, el síndrome de disfunción cognitiva (SDC) está bien caracterizado en perros. Sus manifestaciones conductuales son pérdida de orientación, alteraciones en la relación con el dueño y cambios en los ciclos de sueño y vigilia (6). Estos efectos también se observan en gatos mayores (6). Los estudios epidemiológicos indican que el SDC afecta al 5 % de los perros de 10 a 12 años, al 23 % de los perros de 12 a 14 años y al 41 % de los perros mayores de 14 años (7).

40 Para hacer frente a estos desafíos, existe la necesidad de nuevos productos capaces de prevenir el deterioro cognitivo relacionado con la edad y los trastornos asociados tanto en seres humanos como en animales, y, así, mantener la calidad de vida y la autonomía de las personas mayores durante más tiempo.

Los efectos beneficiosos de comer pescado graso y magro se conocen desde hace mucho tiempo, y hoy en día existe un interés real de los consumidores por los productos del mar. Se sabe que el pescado graso, en general, y el pescado azul, en particular, son ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), especialmente EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico) (todos, por sus siglas en inglés), fosfolípidos y proteínas.

45 Sin embargo, según el leal saber y entender de los autores, no existe ningún producto o ingrediente en el mercado nutracéutico o de alimentos para mascotas que contenga una cantidad significativa de estos ingredientes activos de interés para el cerebro, obtenidos mediante un proceso ecológico mediante el uso de un recurso marino único, en particular, pescados azules tales como las sardinas.

50 Los autores han desarrollado, así, un proceso de hidrólisis particularmente innovador, que permite obtener hidrolizados de pescado azul con efectos beneficiosos para la prevención del deterioro cognitivo relacionado con la edad. Rico en péptidos bioactivos combinados con DHA y fosfolípidos, el hidrolizado tiene especialmente efectos ventajosos en la neuroprotección, la mejor capacidad cognitiva y la reducción del estrés / de la ansiedad.

Los hidrolizados de proteína de pescado, en particular, proteínas de caballa, se describen en el documento FR 2 966 016, por ejemplo.

55

Sumario de la invención

Por lo tanto, el objetivo de la invención es proporcionar un producto «3 en 1» que contenga al menos 3 ingredientes activos de interés para el cerebro, especialmente, péptidos, fosfolípidos y DHA, que permitan prevenir y/o tratar los síntomas del deterioro cognitivo relacionado con la edad y los trastornos asociados en seres humanos y animales.

5 Para ello, según un primer aspecto de la invención, se propone un hidrolizado de proteínas obtenido a partir de al menos una fuente de proteínas de pescado azul, especialmente, al menos de cabezas de pescado azul, que comprende:

- (i) un grado de hidrólisis (GH) de al menos un 10 %,
- (ii) al menos un 80 % de proteínas solubles en agua con un peso molecular menor que 1000 Da,
- 10 (iii) al menos un 0.3 % de fosfolípidos, y
- (iv) al menos un 0.5 % de DHA y EPA.

La invención además se refiere a una composición alimenticia que comprende al menos un hidrolizado de proteínas según la invención, caracterizada por que es un alimento completo o un complemento alimenticio, especialmente un alimento funcional o nutraceutico, pudiendo estar dicha composición alimenticia destinada a seres humanos o animales.

Otro objeto de la invención se refiere a un proceso de preparación de un hidrolizado de proteínas según la invención que comprende las etapas siguientes:

- a. proporcionar una fuente de proteínas;
- b. moler dicha fuente de proteínas;
- 20 c. opcionalmente, ajustar el pH;
- d. añadir al menos una enzima de hidrólisis;
- e. calentar;
- f. separar;
- g. secar.

25 Por último, la invención se refiere a un hidrolizado de proteínas según la invención o una composición farmacéutica que lo contiene, para su utilización como medicamento.

Descripción de las figuras

Todas las figuras de la realización ilustrada de hidrolizados en polvo puros de acuerdo con la presente invención.

30 Figura 1a: Efecto *in vitro* del hidrolizado H1 o DHA sobre la expresión de la citocina proinflamatoria IL-6 en células microgliales BV2 después de 2 h, 6 h y 24 h de tratamiento con LPS (n = 9; **p < 0.01, ***p < 0.001. Control con LPS frente a tratamiento con LPS, \$p < 0.05, \$\$p < 0.01, DHA con LPS frente a H1 con LPS).

Figura 1b: Efecto *in vitro* del hidrolizado H1 o DHA sobre la expresión de la citocina proinflamatoria IL-1β en células microgliales BV2 después de 2 h, 6 h y 24 h de tratamiento con LPS (n = 9; **p < 0.01, ***p < 0.001. Control con LPS frente a tratamiento con LPS, \$p < 0.05, \$\$p < 0.01; DHA con LPS frente a H1 con LPS).

35 Figura 1c: Efecto *in vitro* del hidrolizado H1 o DHA sobre la expresión de la citocina proinflamatoria TNF-α en células microgliales BV2 después de 2 h, 6 h y 24 h de tratamiento con LPS (n = 9; **p < 0.01, ***p < 0.001. Control con LPS frente a tratamiento con LPS, \$p < 0.05, \$\$p < 0.01. DHA con LPS frente a H1 con LPS).

40 Figura 2: Efecto *in vitro* del hidrolizado de H2 sobre la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1β y TNF-α y el factor neurotrófico BDNF en células microgliales BV2 cocultivadas con células neuronales HT22 tratadas durante 6 h con LPS (n = 11; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

Figura 3: Efecto *in vitro* del hidrolizado de H2 sobre la expresión de factores neurotróficos BDNF y NGF en células neuronales HT22 cocultivadas con células microgliales BV2 tratadas durante 6 h con LPS (n = 11).

45 Figura 4: Efecto de la suplementación con hidrolizado de H2 sobre el comportamiento similar a la ansiedad y las tasas de corticosterona en ratones jóvenes y mayores (n = 11-13 por grupo; \$p < 0.05, \$\$p < 0.01; efecto de la dieta **p < 0.01).

Figura 5: Efecto de la suplementación con hidrolizado de H2, con o sin DHA añadido, sobre la reactividad al estrés en ratones jóvenes y mayores (n = 11-13 por grupo; \$p < 0.05, \$\$p < 0.01, \$\$\$p < 0.001. Jóvenes frente a mayores; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Tratamiento frente a tratamiento).

5 Figura 6: Efecto de la suplementación con hidrolizado de H2 sobre la expresión génica de la respuesta al estrés en el hipotálamo de ratones jóvenes y mayores suplementados durante 11 semanas (n = 7-9 por grupo; *p < 0.05, **p < 0.01, #p = 0.0624).

Figura 7: Efecto de la suplementación con hidrolizado de H2, con o sin DHA añadido, sobre la memoria a corto plazo del hipocampo evaluada por la nueva medida del índice de reconocimiento del brazo en la prueba del laberinto en Y (n = 11-13 por grupo; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, #p = 0.0596 frente al azar (33 %)).

10 Figura 8: Efecto de la suplementación con hidrolizado de H2 sobre el aprendizaje espacial y la memoria del hipocampo a largo plazo. (A) Distancia recorrida para llegar a la plataforma durante los 4 días de aprendizaje espacial (\$p < 0.05). (B) Porcentaje de distancia recorrida en los cuadrantes durante la prueba de sonda estándar (\$\$p < 0.01; \$\$\$p < 0.001 frente al azar (25 %); *p < 0.05, **p < 0.01; ***p < 0.001 frente a QO (diana)), (n = 11-13 por grupo).

15 Figura 9: Efecto de la suplementación con hidrolizado de H2 sobre el porcentaje de estrategias espaciales utilizadas durante el aprendizaje espacial en ratones jóvenes y mayores (n = 11-13 por grupo; efecto de la dieta *p < 0.05, efecto de la edad \$p < 0.01).

20 Figura 10: Efecto de la suplementación con hidrolizado de H2 sobre la expresión de marcadores microgliales en el hipocampo de ratones suplementados durante 11 semanas (n = 7-9 por grupo para CD11b y n = 4 por grupo para Iba1; efecto de la dieta *p < 0.05, efecto de la edad \$\$p < 0.01).

Figura 11: Efecto de la suplementación con hidrolizado de H2 sobre la expresión génica de enzimas sintéticas implicadas en la beta-oxidación mitocondrial y peroxisomal en el hipocampo de ratones suplementados durante 11 semanas (n = 7-8 por grupo; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

25 Figura 12: Efecto de la suplementación con hidrolizado de H2 sobre la expresión génica de enzimas sintéticas implicadas en la defensa antioxidante en el hipocampo de ratones suplementados durante 11 semanas (n = 7-8 por grupo; efecto de la dieta *p < 0.05; efecto de la edad \$p < 0.05).

Figura 13: Efecto de la suplementación de 18 días con hidrolizado de H2 o DHA sobre la expresión génica de citocinas proinflamatorias en el hipocampo de ratones en respuesta a LPS (n = 4-6 por grupo; ***p < 0.001).

30 Figura 14: Efecto de la suplementación de 18 días con hidrolizado de H2 o DHA sobre la expresión del gen COX-2 en hipocampo de ratón en respuesta a LPS (n = 4-6 por grupo).

Figura 15: Efecto de la suplementación de 18 días con hidrolizado de H2 o DHA sobre la expresión proteica de Ikb en hipocampo de ratón en respuesta a LPS (n = 5-6 por grupo; *p < 0.05, **p < 0.01).

35 Figura 16: Efecto de la suplementación de 18 días con hidrolizado de H2 o DHA sobre el contenido de oxilipina en el hipocampo de ratón en respuesta a LPS (n = 4-6 por grupo; los valores con superíndices (a, b, c, d, e) difieren significativamente).

Figura 17: Efecto de la suplementación de 18 días con hidrolizado de H2 o DHA sobre la expresión génica de neurotrofinas BDNF y NGF en el hipocampo de ratón en respuesta a LPS (n = 4-6 por grupo; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

Definiciones

40 A menos que se indique específicamente de cualquier otra manera, los porcentajes se expresan en la presente memoria en peso de un producto de referencia.

En esta descripción, los intervalos se definen de forma abreviada para evitar reproducirlos en su totalidad y para describir todos y cada uno de los valores del intervalo. Cualquier valor apropiado en el intervalo se puede elegir como el valor superior, el valor inferior o los valores terminales del intervalo. Por ejemplo, un intervalo de 0.1 a 1.0 representa los valores terminales de 0.1 y 1.0, así como los valores intermedios de 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y todos los intervalos intermedios entre 0.1 y 1.0, como 0.2 a 0.5, 0.2 a 0.8, 0.7 a 1.0, etc. Un intervalo definido como «entre el valor A y el valor B» incluye los valores A y B y, por lo tanto, es equivalente a un intervalo «desde el valor A hasta el valor B». Es más, el término «al menos» comprende el valor que se establece más abajo. Por ejemplo, «al menos el 5 %» debe entenderse que comprende el «5 %». El término «un máximo de» comprende el valor establecido más abajo. Por ejemplo, debe entenderse que «un máximo del 5 %» comprende también el «5 %».

Es más, en esta invención, los valores medibles, tal como una cantidad, deben entenderse como que comprenden desviaciones estándar que puede determinar fácilmente el experto en la técnica perteneciente al campo técnico de referencia. Preferiblemente, estos valores incluyen variaciones de $\pm 5\%$.

Como se utiliza a lo largo de este documento, la forma singular de una palabra comprende el plural y viceversa, a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera. Así, las referencias a «uno», «una» y «el/la» suelen comprender los plurales de los respectivos términos. Por ejemplo, una referencia a un «proceso» o «alimento» comprende una pluralidad de los «procesos» o «alimentos». De manera similar, los términos «comprender», «comprenden» y «que comprende» se interpretarán de forma inclusiva. Del mismo modo, los términos «incluir», «que incluye» y «o» deben considerarse inclusivos. Sin embargo, todos estos términos deben entenderse para abarcar realizaciones exclusivas a las que también se puede hacer referencia mediante la utilización de términos tales como «consiste en».

Los procesos y las composiciones y otras realizaciones ilustradas en la presente descripción no se limitan a metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente descripción, ya que pueden variar, como comprenderá el experto en la técnica.

A menos que se indique de otra forma, todos los términos técnicos y científicos, los términos utilizados en la técnica y las siglas utilizadas en la presente descripción tienen los significados comúnmente aceptados por el experto en la técnica en el campo o los campos de la invención, o en el campo o los campos en los que se utiliza el término. Aunque cualquier composición, proceso, artículo fabricado u otros medios o materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción pueden utilizarse en la práctica de la presente invención, las composiciones, los procesos, los artículos fabricados u otros medios o materiales preferidos se describen en la presente descripción.

Descripción detallada de la invención

Los autores han desarrollado un hidrolizado de pescado azul. Los compuestos de interés del pescado azul, y especialmente proteínas, DHA y fosfolípidos, se combinan en el hidrolizado según la invención. De manera particularmente ventajosa, los autores han optimizado las proporciones de estos compuestos de interés para permitir que se logren efectos biológicos beneficiosos. Más en particular, el hidrolizado comprende una gran proporción de proteínas, principalmente en forma de péptidos. Este hidrolizado, rico por lo tanto en péptidos bioactivos y que comprende fosfolípidos y DHA, presenta especialmente efectos beneficiosos en la prevención del deterioro cognitivo y la ansiedad, particularmente relacionados con la edad.

Hidrolizado de proteínas

En el contexto de esta invención, se han empleado varios métodos de cálculo, especialmente para determinar los perfiles de peso molecular de proteínas y/o péptidos, las cantidades de proteínas, especialmente proteínas solubles, las cantidades de fosfolípidos, DHA, EPA y otros componentes de dicho hidrolizado. Los métodos de cálculo y/o los artículos de referencia que detallan estos métodos se presentan en el Ejemplo 1.7.

Los valores de contenido mencionados en este texto se refieren al hidrolizado en polvo seco sin la ayuda de un medio de secado (denominado «hidrolizado en polvo puro»). Ahora bien, en el proceso de obtención del hidrolizado se puede utilizar ventajosamente un soporte de secado para facilitar la realización de la etapa de secado a gran escala. En este caso, se obtendrá un «hidrolizado en polvo con medio» que comprende una proporción de medio de secado. Típicamente, se utiliza un (2-20) % en peso de medio de secado del hidrolizado líquido antes del secado. Así, para conocer los valores de contenido del hidrolizado en polvo con medio, será suficiente adaptar los valores de contenido proporcionados en este texto con referencia al hidrolizado en polvo puro en proporción a la cantidad de hidrolizado en polvo puro contenido en el hidrolizado en polvo con medio.

Según un primer aspecto, la invención se refiere a un hidrolizado de proteínas obtenido a partir de al menos una fuente de proteínas de pescado azul que comprende:

- (i) un grado de hidrólisis (GH) de al menos un 10 %,
- (ii) al menos un 80 % de proteínas solubles en agua con un peso molecular menor que 1000 Da,
- (iii) al menos un 0.3 % de fosfolípidos, y
- (iv) al menos un 0.5 % de DHA y EPA.

«Pescado azul» son peces pelágicos de aguas profundas. El pescado azul recibe su nombre del color de su piel, que está influenciado por la acumulación de grasa, especialmente ácidos grasos omega-3, en sus músculos. Los pescados azules objeto de esta invención son pequeños pescados azules elegidos de la familia *Clupeidae*, y especialmente las sardinillas (*Sardina pilchardus*, *Sardinops* sp., *Sardinella* sp.) o arenque (*Clupea harengus*); anchoas (*Engraulis encrasicolus*), caballa (*Scomber scombrus*) y peces del género *Trachurus*.

El hidrolizado de proteínas de esta invención se obtiene así por hidrólisis de una fuente de proteínas procedente del pescado azul. «Grado de hidrólisis» (GH) significa el porcentaje de enlaces peptídicos rotos durante la hidrólisis de las proteínas.

El hidrolizado de la invención presenta un grado de hidrólisis de al menos un 10 %, determinándose dicho GH por el método pH-stat como describió J. Adler-Nissen (17). Preferiblemente, el grado de hidrólisis es mayor que el 11 %. En

particular, el grado de hidrólisis de dicha fuente de proteínas es menor que el 20 %, preferiblemente menor que el 18 %, preferiblemente menor que el 17 %, más preferiblemente menor que el 16 %, más preferiblemente menor que el 15 %. La obtención de tal grado de hidrólisis permite ventajosamente disponer de los péptidos y lípidos bioactivos de interés en el hidrolizado según la invención.

- 5 El hidrolizado según la invención comprende, en particular, al menos el 45 %, preferiblemente al menos el 50 %, más preferiblemente al menos el 55 %, aún más preferiblemente al menos el 60 %, lo más preferiblemente al menos el 65 % de proteína total (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). Dicho hidrolizado comprende, en particular, un máximo del 95 %, preferiblemente un máximo del 90 %, más preferiblemente un máximo del 85 %, aún más preferiblemente un máximo del 80 % de proteína total (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro).
- 10 Según una realización particular, el hidrolizado según la invención comprende al menos un 45 %, preferiblemente al menos un 50 %, más preferiblemente al menos un 55 %, aún más preferiblemente al menos un 60 %, lo más preferiblemente al menos un 65 % de proteína soluble (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). Dicho hidrolizado comprende, en particular, un máximo del 95 %, preferiblemente un máximo del 90 %, más preferiblemente un máximo del 85 %, aún más preferiblemente un máximo del 80 %, lo más preferiblemente un máximo del 75 % de proteínas solubles (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro).
- 15

- A los péptidos que componen los hidrolizados se les atribuye un amplio espectro de actividades biológicas: actividades antihipertensivas, hipocolesterolémicas, inmunomoduladoras, antimicrobianas, antioxidantes y opioides (o antiestrés), etc. De manera general, los péptidos bioactivos generalmente comprenden de 4 a 20 aminoácidos. Esto las hace más resistentes a la acción de las enzimas digestivas, mientras que su pequeño tamaño les permite atravesar la barrera intestinal y entrar en el torrente sanguíneo. Ventajosamente, el hidrolizado de proteínas de la invención es rico en péptidos. Especialmente, comprende al menos un 80 % de proteínas solubles en agua con un peso molecular menor que 1000 dalton (Da) (péptidos). En el contexto de esta invención, la expresión «proteínas de peso molecular XX Da» se refiere a aminoácidos y/o péptidos y/o proteínas, según el valor del peso molecular. Los «péptidos» se definen especialmente por un peso molecular menor que 1000 Da. En particular, el hidrolizado de proteínas de la invención
- 20 comprende al menos un 80 % de proteínas solubles en agua de peso molecular menor que 1000 Da, preferiblemente al menos un 83 % de proteínas solubles en agua de peso molecular menor que 1000 Da, más preferiblemente al menos un 84 % de proteínas solubles en agua de peso molecular menor que 1000 Da, más preferiblemente al menos un 85 % de proteínas solubles en agua de un peso molecular menor que 1000 Da, lo más preferiblemente al menos un 86 % de proteínas solubles en agua de un peso molecular menor que 1000 Da. Dicho hidrolizado contiene un
- 25 máximo del 95 % de proteínas solubles en agua de un peso molecular menor que 1000 Da, preferiblemente un máximo del 93 % de proteínas solubles en agua de un peso molecular menor que 1000 Da, más preferiblemente un máximo del 92 % de proteínas solubles en agua de un peso molecular menor que 1000 Da, más preferiblemente un máximo del 91 % de proteínas solubles en agua de un peso molecular menor que 1000 Da, lo más preferiblemente un máximo del 90 % de proteínas solubles en agua de un peso molecular menor que 1000 Da.
- 30

- 35 Según una realización particular, el hidrolizado según la invención presenta el siguiente perfil de peso molecular:

- al menos el 50 %, preferiblemente al menos el 55 %, más preferiblemente al menos el 60 %, más preferiblemente al menos el 65 %, más preferiblemente al menos el 68 % de proteínas solubles en agua con un peso molecular de menos de 500 Da, y preferiblemente un máximo del 95 %, más preferiblemente un máximo del 90 %, más preferiblemente un máximo del 85 %, más preferiblemente un máximo del 82 %, más
- 40 preferiblemente un máximo del 80 % de proteínas solubles en agua con un peso molecular menor que 500 Da;
- al menos un 8 %, preferiblemente al menos un 8.5 %, más preferiblemente al menos un 9 %, más preferiblemente al menos un 9.5 %, más preferiblemente al menos un 10 % de proteínas solubles en agua con un peso molecular entre 500 Da y 1000 Da, y preferiblemente un máximo del 35 %, más preferiblemente un máximo del 30 %, más preferiblemente un máximo del 25 %, más preferiblemente un máximo del 22 %, más
- 45 preferiblemente un máximo del 20 %, más preferiblemente un máximo del 18 %, más preferiblemente un máximo del 17 % de proteínas solubles en agua con un peso molecular entre 500 Da y 1000 Da;
- al menos un 7 %, preferiblemente al menos un 7.5 %, más preferiblemente al menos un 8 %, más preferiblemente al menos un 8.5 %, más preferiblemente al menos un 9 % de proteínas solubles en agua con un peso molecular entre 1000 Da y 5000 Da, y preferiblemente un máximo del 20 %, más preferiblemente un máximo del 18 %, más
- 50 preferiblemente un máximo del 16 %, más preferiblemente un máximo del 15 %, más preferiblemente un máximo del 14 % de proteínas solubles en agua con un peso molecular entre 1000 Da y 5000 Da;
- al menos un 0.10 %, preferiblemente al menos un 0.15 %, más preferiblemente al menos un 0.20 %, más preferiblemente al menos un 0.25 %, más preferiblemente al menos un 0.30 % de proteínas solubles en agua con un peso molecular de más de 5000 Da, y preferiblemente un máximo del 2.0 %, más preferiblemente un
- 55 máximo del 1.5 %, más preferiblemente un máximo del 1.0 %, más preferiblemente un máximo del 0.8 %, más preferiblemente un máximo del 0.7 % de proteínas solubles en agua con un peso molecular de más de 5000 Da.

El hidrolizado comprende preferiblemente entre un 12 % y un 35 %, más preferiblemente entre un 15 % y un 32 %, más preferiblemente entre un 17 % y un 30 %, aún más preferiblemente entre un 20 % y un 28 %, lo más

preferiblemente entre un 22 % y un 26 % de aminoácidos libres en relación con las proteínas totales.

En particular, el hidrolizado comprende preferiblemente entre un 0.3 % y un 2.0 %, más preferiblemente entre un 0.4 % y un 1.8 %, más preferiblemente entre un 0.5 % y un 1.5 %, más preferiblemente entre un 0.6 % y un 1.3 %, lo más preferiblemente entre un 0.7 % y un 1.0 % de triptófano (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro).

- 5 En particular, el hidrolizado comprende preferiblemente entre un 3.0 % y un 9.0 %, más preferiblemente entre un 3.5 % y un 8.5 %, más preferiblemente entre un 4.0 % y un 8.0 %, aún más preferiblemente entre un 4.5 % y un 7.5 %, lo más preferiblemente entre un 5.0 % y un 7.0 % de lisina (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro).

- 10 En particular, el hidrolizado comprende entre un 3 % y un 20 %, más preferiblemente entre un 5 % y un 18 %, más preferiblemente entre un 7 % y un 16 %, aún más preferiblemente entre un 9 % y un 15 %, lo más preferiblemente entre un 10 % y un 14 % de aminoácidos de cadena ramificada (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). «Aminoácidos de cadena ramificada» significa isoleucina, leucina y valina.

- 15 En particular, el hidrolizado comprende entre un 0.5 % y un 8 %, más preferiblemente entre un 1 % y un 7 %, más preferiblemente entre un 1.5 % y un 6 %, aún más preferiblemente entre un 1.8 % y un 5 %, lo más preferiblemente entre un 2 % y un 4 % de aminoácidos que contienen azufre (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). «Aminoácidos que contienen azufre» significa cistina, cisteína y metionina.

- 20 En particular, el hidrolizado comprende entre un 15 % y un 45 %, preferiblemente entre un 17 % y un 42 %, más preferiblemente entre un 20 % y un 39 %, aún más preferiblemente entre un 23 % y un 36 %, lo más preferiblemente entre un 25 % y un 34 % de aminoácidos esenciales (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). En particular, el hidrolizado comprende entre un 5 % y un 20 %, más preferiblemente entre un 6 % y un 18 %, más preferiblemente entre un 7 % y un 16 %, aún más preferiblemente entre un 8 % y un 14 %, lo más preferiblemente entre un 9 % y un 12 % de aminoácidos esenciales libres (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). «Aminoácidos esenciales» significa lisina, metionina, cistina, treonina, triptófano, fenilalanina, tirosina, valina, leucina, isoleucina (para seres humanos).

- 25 El hidrolizado según la invención presenta especialmente un contenido total de materia grasa de al menos el 3 %, preferiblemente al menos el 4 %, más preferiblemente al menos el 5 %, aún más preferiblemente al menos el 6 %, lo más preferiblemente al menos el 7 % (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). Dicho hidrolizado comprende especialmente un contenido de materia grasa total menor o igual que el 20 %, preferiblemente menor o igual que el 19 %, más preferiblemente menor o igual que el 18 %, aún más preferiblemente menor o igual que el 17 %, lo más preferiblemente menor o igual que el 16 % (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro).

- 30 «Materia grasa total» significa el total de lípidos neutros y lípidos polares (o fosfolípidos), que corresponde a los «lípidos totales».

- 35 Entre los lípidos presentes, el hidrolizado de proteínas de la invención contiene ventajosamente fosfolípidos (o lípidos polares). Los fosfolípidos son lípidos estructurales, los principales constituyentes de las membranas. Los ácidos grasos asociados (C20 y C22) a los fosfolípidos tienen un papel esencial en la membrana plasmática ya que aseguran la mejora de su fluidez gracias a dos elementos, la longitud de las cadenas y las rotaciones que permiten los dobles enlaces.

- 40 El hidrolizado de proteínas de la invención comprende al menos un 0.3 % de fosfolípidos (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). En particular, comprende al menos un 0.35 % de fosfolípidos, preferiblemente al menos un 0.4 % de fosfolípidos, más preferiblemente al menos un 0.45 % de fosfolípidos, aún más preferiblemente al menos un 0.5 % de fosfolípidos, aún más preferiblemente al menos un 0.55 % de fosfolípidos, lo más preferiblemente al menos un 0.60 % de fosfolípidos (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). En las realizaciones de la invención, el hidrolizado de proteínas comprende al menos un 1 % de fosfolípidos (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). En particular, comprende al menos un 1.1 % de fosfolípidos, preferiblemente al menos un 1.2 % de fosfolípidos, más preferiblemente al menos un 1.3 % de fosfolípidos, aún más preferiblemente al menos un 1.4 % de fosfolípidos, lo más preferiblemente al menos un 1.5 % de fosfolípidos (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). Dicho hidrolizado contiene un máximo del 3 % de fosfolípidos, preferiblemente un máximo del 2.8 % de fosfolípidos, más preferiblemente un máximo del 2.5 % de fosfolípidos, aún más preferiblemente un máximo del 2.3 % de fosfolípidos, lo más preferiblemente un máximo del 2.1 % de fosfolípidos (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro).

- 50 En particular, los fosfolípidos representan al menos el 4 %, preferiblemente al menos el 4.5 %, más preferiblemente al menos el 5 %, aún más preferiblemente al menos el 5.5 %, aún más preferiblemente al menos el 6 %, lo más preferiblemente al menos el 6.5 % de la materia grasa total del hidrolizado en polvo puro según la invención. En realizaciones particulares, los fosfolípidos representan al menos el 10 %, preferiblemente al menos el 11 %, más preferiblemente al menos el 12 %, aún más preferiblemente al menos el 14 %, lo más preferiblemente al menos el 15 % de la materia grasa total del hidrolizado en polvo puro según la invención. Especialmente, los fosfolípidos representan un máximo del 70 %, preferiblemente un máximo del 65 %, más preferiblemente un máximo del 60 %, aún más preferiblemente un máximo del 55 %, lo más preferiblemente un máximo del 50 % de la materia grasa total del hidrolizado en polvo puro según la invención.

Según una realización preferida, el hidrolizado de la invención es rico en fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina

(PE), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilinositol (PI), cuatro fosfolípidos predominantes en el cerebro.

Según esta realización, dicho hidrolizado contiene especialmente fosfatidilserina en una cantidad de al menos 0.1 mg, preferiblemente al menos 0.2 mg, más preferiblemente al menos 0.3 mg, aún más preferiblemente al menos 0.4 mg, lo más preferiblemente al menos 0.5 mg, por gramo de hidrolizado puro en forma de polvo.

- 5 Según esta realización, dicho hidrolizado contiene especialmente fosfatidilserina en una cantidad menor o igual que 5 mg, preferiblemente menor o igual que 4 mg, más preferiblemente menor o igual que 3 mg, aún más preferiblemente menor o igual que 2.5 mg, lo más preferiblemente menor o igual que 2 mg, por gramo de hidrolizado en polvo puro.

- 10 Dicho hidrolizado también contiene fosfatidiletanolamina en una cantidad de al menos 0.1 mg, preferiblemente al menos 0.2 mg, más preferiblemente al menos 0.25 mg, aún más preferiblemente al menos 0.3 mg, lo más preferiblemente al menos 0.35 mg, por gramo de hidrolizado en polvo puro. En realizaciones particulares, dicho hidrolizado contiene fosfatidiletanolamina en una cantidad de al menos 0.5 mg, preferiblemente al menos 0.8 mg, más preferiblemente al menos 1.2 mg, aún más preferiblemente al menos 1.4 mg, lo más preferiblemente al menos 1.5 mg, por gramo de hidrolizado en polvo puro.

- 15 Dicho hidrolizado también contiene fosfatidiletanolamina en una cantidad menor o igual que 7 mg, preferiblemente menor o igual que 6 mg, más preferiblemente menor o igual que 5 mg, aún más preferiblemente menor o igual que 4.5 mg, lo más preferiblemente menor o igual que 4 mg, por gramo de hidrolizado en polvo puro.

- 20 Dicho hidrolizado contiene además fosfatidilcolina en una cantidad de al menos 1 mg, preferiblemente al menos 1.5 mg, más preferiblemente al menos 2 mg, aún más preferiblemente al menos 2.5 mg, aún más preferiblemente al menos 3 mg, lo más preferiblemente al menos 3.5 mg, por gramo de hidrolizado en polvo puro. En realizaciones particulares, dicho hidrolizado contiene fosfatidilcolina en una cantidad de al menos 5 mg, preferiblemente al menos 6 mg, más preferiblemente al menos 6.5 mg, aún más preferiblemente al menos 7 mg, lo más preferiblemente al menos 7.5 mg, por gramo de hidrolizado en polvo puro.

- 25 Dicho hidrolizado contiene además fosfatidilcolina en una cantidad menor o igual que 20 mg, preferiblemente menor o igual que 18 mg, más preferiblemente menor o igual que 16 mg, aún más preferiblemente menor o igual que 14 mg, lo más preferiblemente menor o igual que 12.5 mg, por gramo de hidrolizado en polvo puro.

- 30 Dicho hidrolizado asimismo contiene fosfatidilinositol en una cantidad de al menos 0.2 mg, preferiblemente al menos 0.3 mg, más preferiblemente al menos 0.4 mg, aún más preferiblemente al menos 0.45 mg, lo más preferiblemente al menos 0.5 mg, por gramo de hidrolizado en polvo puro. En las realizaciones particulares, dicho hidrolizado contiene fosfatidilinositol en una cantidad de al menos 0.5 mg, preferiblemente al menos 0.7 mg, más preferiblemente al menos 0.9 mg, aún más preferiblemente al menos 1 mg, lo más preferiblemente al menos 1.1 mg, por gramo de hidrolizado en polvo puro.

Dicho hidrolizado asimismo contiene fosfatidilinositol en una cantidad menor o igual que 5 mg, preferiblemente menor o igual que 4 mg, más preferiblemente menor o igual que 3 mg, aún más preferiblemente menor o igual que 2.5 mg, lo más preferiblemente menor o igual que 2.1 mg, por gramo de hidrolizado en polvo puro.

- 35 Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son ácidos grasos con al menos dos dobles enlaces en su cadena carbonada. Entre las diferentes familias de PUFA, dos familias, los PUFA n-6 (u omega 6) y n-3 (u omega 3) son de gran interés nutricional. Se diferencian en la posición del primer doble enlace. Estas dos familias se derivan de precursores metabólicos de origen exclusivamente vegetal: el ácido alfa linolénico (n-3) (ALA) y el ácido linoleico (n-6) (LA), que, por lo tanto, debe aportar nuestra dieta. Estos son ácidos grasos esenciales. El ALA se encuentra esencialmente en semillas y aceites de colza, soja, nuez y linaza, y el LA en semillas y aceites de girasol, cacahuete, maíz y uva. Una vez consumido, el ALA se convierte en derivados esenciales para la salud: ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Los peces marinos, que se alimentan de algas y fitoplancton, son una buena fuente de EPA y DHA. El LA se metaboliza en ácido araquidónico (AA), que también es esencial para la salud, y se suministra directamente del consumo de productos de animales terrestres (huevos, carne).

- 45 Los PUFA presentes en el cerebro son mayoritariamente AA y DHA, que son constituyentes de las membranas cerebrales. La incorporación de PUFA es máxima durante el desarrollo del cerebro, mientras que, en el cerebro adulto, el DHA y el AA ya no se acumulan, pero sus concentraciones se mantienen mediante una renovación regular que compensa su utilización. Es probable que estas concentraciones varíen según la ingesta dietética.

- 50 Ventajosamente, el hidrolizado según la invención contiene ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), y, en particular, una proporción importante de omega 3. En particular, comprende al menos un 0.5 %, preferiblemente al menos un 1 %, más preferiblemente al menos un 1.5 %, aún más preferiblemente al menos un 2 %, lo más preferiblemente al menos un 2.5 % de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), y especialmente omega 3 y omega 6 (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). Preferiblemente, dicho hidrolizado contiene un máximo del 5 %, preferiblemente un máximo del 4.7 %, más preferiblemente un máximo del 4.5 %, aún más preferiblemente un máximo del 4.2 %, lo más preferiblemente un máximo del 4.0 % de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), y especialmente omega 3 y omega 6 (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro).

Preferiblemente, el hidrolizado según la invención comprende al menos un 0.5 %, preferiblemente al menos un 0.7 %, más preferiblemente al menos un 1 %, aún más preferiblemente al menos un 1.5 %, lo más preferiblemente al menos un 2 % de omega 3 (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). Preferiblemente, dicho hidrolizado contiene como máximo el 4 %, preferiblemente como máximo el 3.9 %, más preferiblemente como máximo el 3.8 %, aún más preferiblemente como máximo el 3.7 %, lo más preferiblemente como máximo el 3.5 % de omega 3 (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro).

En particular, el omega 3 representa al menos el 15 %, preferiblemente al menos el 20 %, más preferiblemente al menos el 25 %, aún más preferiblemente al menos el 30 % de la materia grasa total del hidrolizado en polvo puro según la invención. Especialmente, los omega 3 representan como máximo el 50 %, preferiblemente como máximo el 45 %, aún más preferiblemente como máximo el 40 %, aún más preferiblemente como máximo el 35 % de la materia grasa total del hidrolizado en polvo puro según la invención.

En particular, el hidrolizado según la invención comprende al menos el 0.05 %, preferiblemente al menos el 0.07 %, más preferiblemente al menos el 0.1 %, aún más preferiblemente al menos el 0.15 %, lo más preferiblemente al menos el 0.2 % de omega 6 (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). Preferiblemente, dicho hidrolizado contiene un máximo del 1.5 %, preferiblemente un máximo del 1.4 %, más preferiblemente un máximo del 1.3 %, aún más preferiblemente un máximo del 1.2 %, lo más preferiblemente un máximo del 1.1 % de omega 6 (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro).

En particular, los omega 6 representan al menos el 0.5 %, preferiblemente al menos el 0.75 %, más preferiblemente al menos el 1 %, aún más preferiblemente al menos el 2 % de la materia grasa total del hidrolizado en polvo puro según la invención. Especialmente, los omega 6 representan un máximo del 25 %, preferiblemente un máximo del 21 %, más preferiblemente un máximo del 17 %, aún más preferiblemente un máximo del 13 % de la materia grasa total del hidrolizado en polvo puro según la invención.

El hidrolizado de la invención es particularmente ventajoso debido a la presencia de DHA y EPA. El hidrolizado de proteínas de la invención comprende al menos el 0.5 % de DHA y EPA (en porcentaje de hidrolizado en polvo puro). En particular, comprende al menos el 0.7 % de DHA y EPA, preferiblemente al menos el 0.9 % de DHA y EPA, aún más preferiblemente al menos el 1 % de DHA y EPA, lo más preferiblemente al menos el 1.5 % de DHA y EPA (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro).

Preferiblemente, dicho hidrolizado contiene un máximo del 5 % de DHA y EPA, preferiblemente un máximo del 4.5 % de DHA y EPA, más preferiblemente un máximo del 4 % de DHA y EPA, aún más preferiblemente un máximo del 3.5 % de DHA y EPA, lo más preferiblemente un máximo del 3.2 % de DHA y EPA (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro).

En particular, DHA y EPA representan al menos el 10 %, preferiblemente al menos el 15 %, más preferiblemente al menos el 20 %, aún más preferiblemente al menos el 22 % de la materia grasa total del hidrolizado en polvo puro según la invención. Especialmente, el DHA y el EPA representan un máximo del 40 %, preferiblemente un máximo del 35 %, más preferiblemente un máximo del 30 %, aún más preferiblemente un máximo del 27 % de la materia grasa total del hidrolizado en polvo puro según la invención.

Según otra realización preferida, contiene especialmente DHA en una cantidad de al menos 2 mg, preferiblemente al menos 3 mg, más preferiblemente al menos 5 mg, aún más preferiblemente al menos 7 mg, lo más preferiblemente al menos 9 mg, por gramo de hidrolizado en polvo puro.

Dicho hidrolizado contiene preferiblemente DHA en una cantidad menor o igual que 30 mg, preferiblemente menor o igual que 27 mg, más preferiblemente menor o igual que 25 mg, aún más preferiblemente menor o igual que 23 mg, lo más preferiblemente menor o igual que 20 mg, por gramo de hidrolizado en polvo puro.

En particular, el DHA representa al menos el 5 %, preferiblemente al menos el 5.3 %, más preferiblemente al menos el 5.7 %, aún más preferiblemente al menos el 5.9 %, lo más preferiblemente al menos el 6 % de la grasa total del hidrolizado en polvo puro según la invención. Especialmente, el DHA representa como máximo el 30 %, preferiblemente como máximo el 27 %, más preferiblemente como máximo el 25 %, aún más preferiblemente como máximo el 22 %, lo más preferiblemente como máximo el 20 % de la materia grasa total del hidrolizado en polvo puro según la invención.

En combinación con péptidos, el DHA, presente, pero no predominante, tiene ventajosamente efectos beneficiosos.

Según otra realización preferida, dicho hidrolizado de proteínas también contiene EPA en una cantidad de al menos 0.5 mg, preferiblemente al menos 1 mg, más preferiblemente al menos 2 mg, aún más preferiblemente al menos 3 mg, lo más preferiblemente al menos 4 mg, por gramo de hidrolizado en polvo puro.

Dicho hidrolizado contiene preferiblemente EPA en una cantidad menor o igual que 25 mg, preferiblemente menor o igual que 24 mg, preferiblemente menor o igual que 23 mg, más preferiblemente menor o igual que 22 mg, aún más preferiblemente menor o igual que 21 mg, lo más preferiblemente menor o igual que 20 mg, por gramo de hidrolizado en polvo puro.

En particular, el EPA representa al menos el 1 %, preferiblemente al menos el 2 %, preferiblemente al menos el 4 %, aún más preferiblemente al menos el 6 % de la materia grasa total del hidrolizado en polvo puro según la invención. Especialmente, el EPA representa como máximo el 40 %, preferiblemente como máximo el 35 %, más preferiblemente como máximo el 30 %, aún más preferiblemente como máximo el 25 % de la materia grasa total del hidrolizado en polvo puro según la invención.

De forma particularmente ventajosa, una proporción de omega 3 en el hidrolizado según la invención, y especialmente DHA y EPA, se une a los fosfolípidos.

En particular, el hidrolizado según la invención comprende al menos el 0.3 %, preferiblemente al menos el 0.35 %, más preferiblemente al menos el 0.4 %, aún más preferiblemente al menos el 0.45 %, lo más preferiblemente al menos el 0.5 % de omega 3 unido a los fosfolípidos. Preferiblemente, dicho hidrolizado contiene un máximo del 1 %, preferiblemente un máximo del 0.95 %, más preferiblemente un máximo del 0.9 %, aún más preferiblemente un máximo del 0.85 %, lo más preferiblemente un máximo del 0.8 % de omega 3 unido a los fosfolípidos.

Más particularmente, el hidrolizado según la invención comprende al menos el 0.15 %, preferiblemente al menos el 0.20 %, más preferiblemente al menos el 0.25 %, aún más preferiblemente al menos el 0.30 %, lo más preferiblemente al menos el 0.35 % de DHA unido a los fosfolípidos. Preferiblemente, dicho hidrolizado contiene un máximo del 1 %, preferiblemente un máximo del 0.9 %, más preferiblemente un máximo del 0.8 %, aún más preferiblemente un máximo del 0.7 %, lo más preferiblemente un máximo del 0.65 % de DHA unido a fosfolípidos.

Más particularmente, el hidrolizado según la invención comprende al menos el 0.050 %, preferiblemente al menos el 0.055 %, más preferiblemente al menos el 0.060 %, aún más preferiblemente al menos el 0.070 %, lo más preferiblemente al menos el 0.080 % de EPA unido a los fosfolípidos. Preferiblemente, dicho hidrolizado contiene un máximo del 0.2 %, preferiblemente un máximo del 0.18 %, más preferiblemente un máximo del 0.15 %, aún más preferiblemente un máximo del 0.13 %, lo más preferiblemente un máximo del 0.11 % de EPA unido a los fosfolípidos.

En particular, el hidrolizado según la invención comprende al menos el 0.005 %, preferiblemente al menos el 0.01 %, más preferiblemente al menos el 0.015 %, aún más preferiblemente al menos el 0.02 %, lo más preferiblemente al menos el 0.025 % de omega 6 unido a fosfolípidos. Preferiblemente, dicho hidrolizado contiene un máximo del 0.5 %, preferiblemente un máximo del 0.4 %, más preferiblemente un máximo del 0.3 %, aún más preferiblemente un máximo del 0.2 %, lo más preferiblemente un máximo del 0.15 % de omega 6 unido a los fosfolípidos.

Los «lípidos neutros» o «grasas neutras» o «lípidos simples», constituidos esencialmente de triglicéridos (o triacilglicérols), representan la principal forma de almacenamiento de grasa en las células adiposas. Según una realización particular, el hidrolizado según la invención comprende al menos un 0.1 %, preferiblemente al menos un 0.2 %, más preferiblemente al menos un 0.3 %, aún más preferiblemente al menos un 0.4 %, lo más preferiblemente al menos un 0.5 % de lípidos neutros, preferiblemente triglicéridos (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). Preferiblemente, dicho hidrolizado contiene como máximo un 15 %, preferiblemente como máximo un 14 %, más preferiblemente como máximo un 12 %, aún más preferiblemente como máximo un 10 % de lípidos neutros, preferiblemente triglicéridos (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro).

Según una realización particular, el hidrolizado según la invención comprende al menos 0.05 mg, preferiblemente al menos 0.10 mg, más preferiblemente al menos 0.15 mg, aún más preferiblemente al menos 0.20 mg de plasmalógenos por gramo de hidrolizado en polvo puro. Preferiblemente, dicho hidrolizado contiene un máximo de 1.0 mg, preferiblemente un máximo de 0.8 mg, más preferiblemente un máximo de 0.7 mg, aún más preferiblemente un máximo de 0.5 mg de plasmalógenos por gramo de hidrolizado en polvo puro.

El hidrolizado se puede presentar en cualquier forma, especialmente en forma de líquido o polvo. Según una realización particular, el hidrolizado según la invención se presenta en forma de polvo. Según esta realización particular, el hidrolizado comprende preferiblemente al menos un 1 %, preferiblemente al menos un 2 % de humedad, más preferiblemente al menos un 3 %, aún más preferiblemente al menos un 4 % de humedad (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). Es más, dicho hidrolizado comprende como máximo el 15 %, preferiblemente como máximo el 12 %, más preferiblemente como máximo el 10 %, aún más preferiblemente como máximo el 9 %, lo más preferiblemente como máximo el 8 % de humedad (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro).

El hidrolizado contiene materia mineral. En particular, el hidrolizado puede comprender preferiblemente al menos un 5 %, preferiblemente al menos un 6 %, más preferiblemente al menos un 7 %, aún más preferiblemente al menos un 8 %, lo más preferiblemente al menos un 8.5 % de materia mineral (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro). Es más, dicho hidrolizado comprende como máximo un 20 %, preferiblemente como máximo un 15 %, más preferiblemente como máximo un 12 %, aún más preferiblemente como máximo un 11 %, lo más preferiblemente como máximo un 10 % de materia mineral (porcentaje en peso de hidrolizado en polvo puro).

En particular, el hidrolizado comprende preferiblemente entre 2 mg y 8 mg, más preferiblemente entre 2.3 mg y 7.8 mg, más preferiblemente entre 2.5 mg y 7.5 mg, aún más preferiblemente entre 2.8 mg y 7.3 mg, lo más preferiblemente entre 3 mg y 7 mg de selenio por kilogramo de hidrolizado en polvo puro según la invención.

En particular, el hidrolizado comprende preferiblemente entre 12 mg y 60 mg, más preferiblemente entre 15 mg y

55 mg, más preferiblemente entre 18 mg y 50 mg, aún más preferiblemente entre 20 mg y 48 mg, lo más preferiblemente entre 22 mg y 45 mg de zinc por kilogramo de hidrolizado en polvo puro según la invención.

En particular, el hidrolizado comprende preferiblemente entre 400 mg y 1500 mg, más preferiblemente entre 450 mg y 1450 mg, más preferiblemente entre 500 mg y 1400 mg, aún más preferiblemente entre 550 mg y 1350 mg, lo más preferiblemente entre 600 mg y 1300 mg de calcio por kilogramo de hidrolizado en polvo puro según la invención.

En particular, el hidrolizado comprende preferiblemente entre 2000 mg y 8000 mg, más preferiblemente entre 2150 mg y 7500 mg, más preferiblemente entre 2300 mg y 7000 mg, aún más preferiblemente entre 2500 mg y 6500 mg, lo más preferiblemente entre 2750 mg y 6000 mg de fósforo por kilogramo de hidrolizado en polvo puro según la invención.

El hidrolizado comprende preferiblemente entre 0.01 mg y 1 mg, más preferiblemente entre 0.03 mg y 0.7 mg, más preferiblemente entre 0.05 mg y 0.5 mg, aún más preferiblemente entre 0.07 mg y 0.4 mg, lo más preferiblemente entre 0.1 mg y 0.2 mg de vitamina B12 por 100 gramos de hidrolizado en polvo puro según la invención.

El hidrolizado comprende preferiblemente entre 0.004 mg y 0.06 mg, más preferiblemente entre 0.005 mg y 0.05 mg, más preferiblemente entre 0.006 mg y 0.04 mg, aún más preferiblemente entre 0.007 mg y 0.03 mg, lo más preferiblemente entre 0.008 mg y 0.02 mg de vitamina D3 por 100 gramos de hidrolizado en polvo puro según la invención.

Según una realización preferida, la fuente de proteínas utilizada para la invención es al menos de cabezas de pescado azul. Según otra realización preferida, dicha fuente de proteínas se deriva de las sardinas. Según una realización preferida, dicha fuente de proteínas se deriva al menos de cabezas de sardina.

Las sardinas son pequeños peces pelágicos que se alimentan de plancton, huevos y larvas de crustáceos. Su intervalo geográfico se extiende, en particular, desde la parte central del Mar del Norte hasta el Cabo Blanco en Mauritania. La especie también es abundante en el Mediterráneo hasta el Mar Negro. El pescado graso que tiene un contenido en lípidos del 3.2 % al 15 %, es interesante por sus cualidades nutricionales. En efecto, las sardinas son uno de los pescados más ricos en lípidos y específicamente en ácidos grasos de la familia omega 3 (20 % a 30 % de los ácidos grasos totales) con una relación de ácidos grasos insaturados a ácidos grasos saturados cercana a 2. Las sardinas tienen pocos glúcidos (<0.1 % con respecto al peso fresco), pero son ricas en proteínas de muy alto valor nutricional, una fuente de aminoácidos indispensables, 100 g de sardinas son suficientes para cubrir el 100 % de las necesidades diarias de aminoácidos. Además de la presencia de proteínas de calidad, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de cadena larga (EPA DHA), fosfolípidos, etc., las sardinas además contienen minerales tal como el hierro y el zinc; contienen poco sodio, pero son ricas en calcio, magnesio, potasio y selenio. Contienen vitaminas A, D, B3 (nicotinamida), B6 (piridoxina), B12 (cobalamina) y E (d tocoferol). Una porción de 150 g de sardinas cubre las necesidades diarias de vitaminas D y E de un ser humano «estándar». Asimismo, son muy interesantes por su aporte en coenzima Q10. Las sardinas son pescados al comienzo de la cadena trófica, lo que presenta la ventaja de contener concentraciones bajas de contaminantes de tipo metales pesados, tales como el metilmercurio o los PCB.

Según otra realización, la fuente de proteínas utilizada para la invención comprende cabezas de pescado azul, preferiblemente dicha fuente de proteínas se deriva solamente de cabezas. En una realización alternativa, la fuente de proteínas utilizada para la invención comprende cabezas y vísceras de pescado azul, preferiblemente dicha fuente de proteínas se deriva de cabezas y comprende además vísceras, más preferiblemente dicha fuente de proteínas utilizada para la invención se deriva de cabezas y vísceras. En una realización particular, las vísceras representan menos del 30 % en peso de la fuente de proteínas, preferiblemente menos del 20 % en peso, más preferiblemente menos del 15 % en peso. Si la fuente de proteínas comprende vísceras, las enzimas endógenas de dichas vísceras están preferiblemente inactivadas. Esto evita la autólisis de la fuente de proteínas y produce un hidrolizado de proteínas con características físico químicas estandarizadas. Ventajosamente, el hidrolizado de la invención que comprende cabezas y/o vísceras permite agregar valor a los coproductos marinos y asegurar una pesca sostenible a largo plazo. Estos coproductos, recuperados durante el procesamiento de pescados y mariscos (comprendido especialmente el fileteado, eviscerado, descabezado, etc.), normalmente no son consumidos por seres humanos. La obtención de estos hidrolizados constituye, así, un enfoque estratégico de interés para rehabilitar la fracción proteica de los coproductos marinos.

El pescado azul, y especialmente las sardinas, son, por lo tanto, una excelente fuente de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), omega 3 y omega 6, y, en particular, una excelente fuente de DHA. Sin embargo, la cantidad y la naturaleza de los ácidos grasos pueden variar en función de la dieta del pez. Por lo tanto, el contenido de DHA en los hidrolizados puede estar sujeto a ciertas variaciones especialmente en función de criterios tales como la temporada o la localización de la pesca. Así, en una realización particular, el hidrolizado de proteínas de la invención se complementa con DHA. En otras palabras, se puede añadir a dicho hidrolizado según la invención DHA exógeno u otra fuente distinta del hidrolizado, que comprenda DHA. Especialmente, el hidrolizado puede complementarse con DHA en una relación de hidrolizado : DHA entre 1:5 y 5:1, preferiblemente entre 1:2 y 2:1.

Proceso de hidrólisis

Entre los procesos biotecnológicos que ofrecen un campo de investigación y aplicaciones industriales muy dinámico, la hidrólisis enzimática de proteínas permite generar una fracción soluble denominada «hidrolizado». Compuesto

mayoritariamente por péptidos y aminoácidos libres, el hidrolizado de la invención se caracteriza por nuevas propiedades funcionales, nutricionales y biológicas, y encuentra aplicaciones en nutrición humana y animal y en el campo de los nutracéuticos y los medicamentos. Es conocido por el experto en la técnica que la selección de las materias primas y las condiciones de la reacción de hidrólisis son determinantes para obtener un hidrolizado con un perfil peptídico y molecular particular. Igualmente, las propiedades bioquímicas del hidrolizado condicionan su actividad biológica. Así, dos hidrolizados derivados de la misma fuente de proteínas, pero con diferentes perfiles de péptidos o contenido de lípidos pueden no presentar el mismo grado de actividad, o incluso diferentes actividades biológicas.

«Fuente de proteínas» o «materia proteica» o «fracción de proteína» o «sustrato proteico» significa un material de origen natural, preferiblemente de origen marino, preferiblemente de pescado azul, constituido en parte de proteínas y/o péptidos y/o aminoácidos.

El proceso de hidrólisis enzimática desarrollado en el marco de la presente invención es un proceso suave, sin disolventes, que tiene lugar en un medio acuoso: los coproductos del pescado azul, especialmente al menos las cabezas de pescado azul, y preferiblemente al menos las cabezas de sardina, se ponen en presencia de una sola enzima o de una mezcla de enzimas, de tipo endo- y/o exopeptidasa, en un medio que contiene agua, cuyo pH y temperatura se han ajustado para corresponder a la actividad óptima de las enzimas utilizadas (según las recomendaciones del fabricante). Las enzimas descomponen las proteínas contenidas en los coproductos al romper los enlaces peptídicos entre los aminoácidos que constituyen las proteínas. Como cada enzima tiene una acción selectiva, la elección de la(s) enzima(s) permite segmentar de manera específica los enlaces peptídicos que hay que cortar. Los hidrolizados luego se someten a etapas de separación y secado para obtener un polvo en forma estabilizada.

«Enzima endopeptidasa» o «endoproteasa» significa una enzima proteolítica capaz de romper enlaces peptídicos dentro de un péptido y/o proteína, es decir, enlaces peptídicos entre aminoácidos no terminales. Entre los ejemplos de endoproteasas se encuentran especialmente:

endopeptidasas de serina, incluida la tripsina, que corta después los aminoácidos arginina o lisina, a menos que esta última vaya seguida de prolina; quimiotripsina, que corta después los aminoácidos fenilalanina, triptófano o tirosina, a menos que le siga prolina; elastasa, que corta los residuos de alanina, glicina, serina o valina, a menos que le siga prolina; subtilisina, que cataliza la hidrólisis de proteínas con baja especificidad en materia de enlace peptídico y actúa preferiblemente en los alrededores de un gran residuo de aminoácido sin carga;

endopeptidasas de cisteína tales como papaína y ficina, que requieren la presencia de un grupo SH libre en su sitio activo para ejercer acción proteolítica;

endopeptidasas de ácido aspártico tales como la pepsina, que contienen un residuo de ácido aspártico implicado en la catálisis en el sitio activo. La pepsina corta antes los residuos de leucina, fenilalanina, triptófano o tirosina, a menos que estén precedidos por una prolina.

«Enzima exopeptidasa» o «exoproteasa» significa una enzima proteolítica capaz de romper enlaces peptídicos en el extremo N terminal o C terminal de un péptido y/o una proteína. Estas se conocen como aminopeptidasa o carboxipeptidasa, respectivamente. Las exopeptidasas permiten la generación de monómeros, es decir, aminoácidos libres, en el hidrolizado.

Según una realización preferida particularmente, el hidrolizado de proteínas de la invención se obtiene mediante un proceso de hidrólisis enzimática que comprende las etapas siguientes:

- a. proporcionar una fuente de proteínas;
- b. moler dicha fuente de proteínas;
- c. opcionalmente, ajustar el pH;
- d. añadir al menos una enzima de hidrólisis;
- e. calentar;
- f. separar;
- g. secar.

En función del sustrato proteico de partida, el grado de hidrólisis deseado, especialmente mayor que el 10 %, pero asimismo el contenido específico de péptidos de tamaños determinados, especialmente péptidos de tamaño menor que 5000 Da, o menor que 2000 Da, o menos de 1000 Da o menor que 500 Da, el experto en la técnica sabrá adaptar las condiciones de reacción de manera específica. La etapa de hidrólisis enzimática requiere determinar las enzimas que hay que utilizar y ajustar varios parámetros tales como la razón enzima/sustrato, el tiempo de hidrólisis, la velocidad de agitación, el pH y la temperatura.

Según un modo particular, en la etapa (a), la fuente de proteínas está constituida preferiblemente por pescado azul,

especialmente sardinas, preferiblemente al menos cabezas de pescado azul y lo más preferiblemente al menos cabezas de sardina.

En la etapa (b), la molienda de la fuente de proteínas permite obtener ventajosamente el tamaño de partícula apropiado. La molienda debe ser lo más fina posible para favorecer la acción de las enzimas. Idealmente, todas las partículas deberían tener un tamaño cercano a los 5 mm, preferiblemente cercano a los 3 mm. La etapa de molienda se puede efectuar mediante el uso de una fuente de proteínas seca o húmeda. La etapa de molienda requiere así ajustar la duración y la velocidad según el instrumento empleado y la naturaleza seca o húmeda del material que hay que moler, que es lo que el experto en la técnica es capaz de hacer en el curso de su trabajo rutinario. La adición de agua requiere el ajuste de la velocidad, la duración y la razón agua/sólido en función del instrumento que haya que emplear, todo ello dentro del alcance del experto en la técnica. Preferiblemente, se añade algo de agua a la fuente de proteínas. Es preferiblemente igual a 0.1 a 1 veces la masa de dicha fuente de proteínas y no excede de esta cantidad.

Según una realización, el proceso de hidrólisis comprende una etapa opcional de adición de agente antioxidante. Esta adición opcional puede tener lugar en varias etapas del proceso, especialmente antes o después de la molienda (etapa b), pero asimismo antes del secado (etapa g). «Antioxidante» significa un compuesto químico o natural capaz de inhibir las reacciones de oxidación y prevenir especialmente la formación de radicales libres. El experto en la técnica sabrá adaptar la naturaleza y la cantidad de antioxidante que haya que usar para adaptar mejor la reacción de hidrólisis, en función especialmente de la fuente de proteínas utilizada.

La etapa (c) de ajuste de pH opcional permite adaptar el pH de la fuente de proteínas molida según sea necesario. En efecto, es importante que el pH de esta masa molida corresponda al pH óptimo para el funcionamiento de dicha enzima de hidrólisis. El experto en la técnica conoce los medios para adaptar el pH de dicha masa molida, especialmente mediante la utilización de bases y/o ácidos adaptados a los procesos agroalimentarios, especialmente una base tal como el bicarbonato de sodio permitirá aumentar el pH de dicha masa molida, mientras que un ácido como el ácido cítrico o el ácido acético permitirán bajarlo.

En particular, en la etapa (d), al menos dicha enzima utilizada contiene al menos una endoproteasa y/o al menos una exoproteasa, preferiblemente al menos una endoproteasa, tal como, por ejemplo, serina endopeptidasa, ácido aspártico endopeptidasa y/o cisteína endopeptidasa, preferiblemente serina endopeptidasa. Preferiblemente, la endopeptidasa de la invención es una endopeptidasa alcalina y preferiblemente una endopeptidasa de origen microbiano.

Según una realización preferida de la etapa (d), al menos dicha enzima utilizada contiene al menos una alcalasa, en particular, la alcalasa 2.4 L, como se ilustra en los ejemplos.

Ventajosamente, el calentamiento según la etapa (e) se realiza durante 1 a 20 horas, preferiblemente entre 2 y 12 horas, a una temperatura entre 25 °C y 70 °C, preferiblemente entre 40 °C y 60 °C, y preferiblemente alrededor de 55 °C. Como bien sabe el experto en la técnica, la etapa de calentamiento puede comprender varias etapas de temperatura, especialmente con vistas a desactivar las enzimas por calentamiento, típicamente entre 80 °C y 105 °C, por ejemplo, durante 15 a 40 minutos.

En un modo particular, la mezcla se filtra previamente en un tamiz para retirar las partículas sólidas (en particular, los espinas).

Luego, el medio de reacción se separa, según la etapa (f), mediante la utilización de cualquier técnica de separación conocida adecuada, como centrifugación o decantación. Preferiblemente, el medio de reacción se separa por centrifugación, especialmente centrifugación vertical y/u horizontal. La etapa de separación requiere el ajuste de parámetros tales como velocidad, temperatura, tiempo y pH, lo cual es una cuestión de aplicación rutinaria de los conocimientos generales del experto en la técnica. Esta etapa permite ventajosamente la recuperación de la fracción soluble, que contiene péptidos solubles, fosfolípidos y DHA/EPA, y la eliminación de las proteínas insolubles, así como también parte de la materia grasa, que contiene mayoritariamente lípidos neutros, y, en particular, triglicéridos.

A continuación, la fase acuosa obtenida tras la separación se seca (etapa g) mediante la utilización de cualquier técnica de secado adecuada conocida, tal como liofilización o secado por evaporación, especialmente el secado por atomización o desecación. Opcionalmente, es posible realizar una etapa de concentración previa a la etapa de secado. El experto en la técnica sabrá elegir la técnica de secado más adecuada y optimizar las condiciones de secado en función de la utilización que se vaya a dar al hidrolizado de proteínas de la invención. En particular, el experto en la técnica puede optar por utilizar al menos un medio de secado. El término «medio de secado» se refiere a cualquier compuesto convencional para llevar a cabo una etapa de secado dentro del alcance técnico de la invención. Por ejemplo, se puede elegir un medio de secado adecuado entre proteínas microbianas (por ejemplo, levaduras), proteínas lácteas (por ejemplo, caseinatos), almidones hidrolizados (por ejemplo, maltodextrinas), almidones modificados (por ejemplo, almidón succinato de otenilo), ciclodextrinas, gomas (por ejemplo, goma arábiga), fibras (por ejemplo, fibras de celulosa) y sus combinaciones.

En particular, para obtener el hidrolizado de proteínas de la invención, es decir, un hidrolizado rico en péptidos y que comprenda fosfolípidos y DHA/EPA, es imprescindible: (1) realizar una hidrolizado de proteínas con un grado de hidrólisis de al menos el 10 %, y (2) llevar a cabo una separación de las fases.

Según una realización particular, el proceso de hidrólisis enzimática comprende además una etapa de suplementación con DHA. El hidrolizado de proteínas de la invención se obtiene pues mediante un proceso de hidrólisis enzimática que comprende las etapas siguientes:

- a. proporcionar una fuente de proteínas;
- 5 b. moler dicha fuente de proteínas;
- c. opcionalmente, ajustar el pH;
- d. añadir al menos una enzima de hidrólisis;
- e. calentar;
- f. separar;
- 10 f' adicionar DHA;
- g. secar.

En una realización alternativa, la etapa de adición de DHA (etapa (f')) se realiza después de la etapa (g) de secado. El DHA puede ser especialmente DHA «puro» o un ingrediente que contenga cantidades significativas de DHA. Como ejemplo no limitativo, dicho ingrediente que contiene una cantidad significativa de DHA puede ser un aceite de krill.

- 15 Así, otro aspecto de la invención se refiere a un proceso de preparación de un hidrolizado de proteínas según la invención que comprende las etapas siguientes:
 - a. proporcionar una fuente de proteínas;
 - b. moler dicha fuente de proteínas;
 - c. opcionalmente, ajustar el pH;
 - 20 d. añadir al menos una enzima de hidrólisis;
 - e. calentar;
 - f. separar;
 - g. secar.

- 25 En una realización particular, este proceso comprende además una etapa de adición de antioxidante, que puede realizarse especialmente antes o después de la etapa (b) de trituración, o antes de la etapa (g) de secado.

En otra realización particular, este proceso comprende además una etapa (f') de suplementación con DHA que se realiza después de la etapa (f) de separación y antes de la etapa (g) de secado. En una realización alternativa, este proceso comprende una etapa (g') de suplementación con DHA que se realiza después de la etapa (g) de secado.

- 30 En otra realización particular, este proceso comprende además una etapa de adición de antioxidantes y una etapa de suplementación con DHA. Dicha etapa de adición de antioxidantes puede realizarse especialmente antes o después de la etapa (b) de molienda, o antes de la etapa (g) de secado; pudiendo realizarse dicha etapa de suplementación con DHA después de la etapa (f) de separación y antes de la etapa (g) de secado, o realizarse después de la etapa (g) de secado.

Composición alimenticia y/o farmacéutica

- 35 El hidrolizado de proteínas de la invención (también denominado en la presente memoria como hidrolizado en polvo puro) es, por lo tanto, un hidrolizado rico en péptidos y contiene fosfolípidos, DHA y EPA. Así, cuando se administra en cantidades suficientes, el hidrolizado de la invención proporciona ventajosamente beneficios para la salud.

Composición alimenticia

- 40 Según otro aspecto, la invención se refiere a una composición alimenticia que comprende al menos un hidrolizado de proteínas según la invención y tal como se ha definido anteriormente, está caracterizada por que es un alimento completo o un complemento alimenticio, especialmente un alimento funcional o nutracéutico.

Según una primera realización preferida, la composición alimenticia de la invención es un complemento alimenticio, especialmente un alimento funcional o nutracéutico para seres humanos.

- 45 «Ser humano» significa un individuo humano, hombre o mujer, preferiblemente un adulto, en particular, una persona mayor, en riesgo de desarrollar trastornos cognitivos relacionados con la edad.

Ventajosamente, el sujeto se distingue en función de la utilización terapéutica o profiláctica de dicha composición alimenticia. Así, en el contexto de la utilización terapéutica, dicho sujeto es un adulto preferiblemente de 60 años o más. Para utilización profiláctica, especialmente para prevenir el riesgo de deterioro cognitivo, el sujeto es un adulto, preferiblemente de al menos 50 años o más.

- 5 La expresión «complemento alimenticio» se refiere a un producto para ingerirse además de la dieta normal. Especialmente, es una composición concentrada en nutrientes, especialmente péptidos, fosfolípidos, DHA, vitaminas y/o minerales, que comprende sustancias con fines nutricionales o fisiológicos. «Alimento funcional» significa un alimento que es similar en apariencia a los alimentos convencionales, que forma parte de la dieta normal y proporciona beneficios fisiológicos demostrados y/o reduce el riesgo de enfermedades crónicas más allá de las funciones
- 10 nutricionales básicas. Un «alimento nutracéutico» es un alimento en forma de pastilla, polvo u otra forma medicinal que no suele asociarse con los alimentos. El alimento nutracéutico tiene un efecto fisiológico beneficioso o protege contra enfermedades crónicas.

- Según esta realización, dicha composición alimenticia que comprende al menos un hidrolizado de proteínas según la invención se consume por vía oral. Por lo tanto, se puede beber y/o ingerir. Ventajosamente, la composición alimenticia
- 15 de la invención puede presentarse en forma de polvo. Dicha composición alimenticia en forma de polvo puede así envasarse en cápsulas, especialmente cápsulas para disolver y/o tragar.

- Así, dicho hidrolizado de proteínas está presente en la composición alimenticia de la invención en cantidad suficiente para permitir, en base a una dosis diaria, una ingesta diaria de dicho hidrolizado de entre 0.2 gramos (g) y 7 g, preferiblemente entre 0.2 g y 3 g y más preferiblemente de 0.5 g a 3 g. Estas dosis se dan como indicación para un
- 20 individuo humano que pesa 60 kg. El experto en la técnica sabrá adaptar estas dosis especialmente en función de la edad y/o el peso y/o la dieta y/o el estado general de salud del individuo.

Otro objeto de la invención se refiere a un producto alimenticio caracterizado por que comprende como ingrediente una composición alimenticia tal como se ha definido anteriormente.

- Así, en una realización particularmente ventajosa, la composición de la invención puede incorporarse a alimentos y/o
- 25 bebidas. A modo de ejemplo no limitativo, la composición de la invención puede incorporarse durante la preparación de zumos de frutas y/o vegetales, productos lácteos fermentados o no, como, por ejemplo, yogures o bebidas de yogur, quesos, pero también helados; también puede incorporarse durante la preparación de galletas, barritas, grageas, pastillas, caramelos o chicles, etc.

- Según una segunda realización preferida, la composición alimenticia de la invención es un alimento para mascotas, preferiblemente un alimento para perros o gatos.
- 30

Según esta realización, la composición alimenticia para mascotas es preferiblemente un alimento completo.

- Los términos «mascota», «animal doméstico» y «animal» son sinónimos y se refieren a cualquier animal doméstico, comprendidos, entre otros, gatos, perros, conejos, cobayas, hurones, hámsteres, ratones, jerbos, pájaros, caballos, vacas, cabras, ovejas, burros, cerdos y similares, y preferiblemente gatos o perros. Preferiblemente, el animal es un
- 35 adulto, especialmente uno mayor, y con riesgo de desarrollar trastornos cognitivos relacionados con la edad. Según una realización particular, el animal es un perro, preferiblemente mayor de 6 años, más preferiblemente mayor de 7 años.

«Alimento para mascotas» significa cualquier alimento que se pueda presentar en cualquier forma, sólida, seca, húmeda, semihúmeda o sus combinaciones. Las golosinas están incluidas en el alimento para mascotas.

- «Alimento completo» significa un alimento que contiene todos los nutrientes conocidos necesarios para el receptor o
- 40 consumidor previsto del alimento, en cantidades y proporciones apropiadas basadas, por ejemplo, en recomendaciones de autoridades reconocidas o competentes en el campo de la alimentación de mascotas considerada (especie/raza/tipo/edad/...). Estos alimentos constituyen la única fuente de ingesta nutricional para satisfacer las necesidades de las mascotas, sin la adición de fuentes de alimentos suplementarios. Los alimentos para mascotas nutricionalmente equilibrados son ampliamente conocidos y utilizados en la técnica.

- 45 Existen tres categorías o clases principales de alimentos completos para mascotas, en función de si el contenido de humedad es bajo, medio o alto:

productos secos o que presentan poca humedad (con menos de aproximadamente el 14 % de humedad), tal como croquetas; estos son generalmente muy nutritivos, se pueden envasar, por ejemplo, en bolsas o cajas y son muy adecuados para su almacenamiento y utilización;

- 50 productos en latas o bolsas o húmedos o que presentan alto contenido de humedad (que tienen más de aproximadamente el 50 % de humedad), tales como «productos X con trozos»: habitualmente productos con alto contenido de carne;

productos semihúmedos o semisecos o secos y tiernos o húmedos y tiernos o productos con un contenido de humedad medio o intermedio (que tengan de aproximadamente un 14 % a aproximadamente un 50 % de humedad), tal como

el paté: generalmente envasados en bolsas o cajas apropiadas.

El término «croqueta» como se utiliza en la presente memoria se refiere a fragmentos de partículas o trozos formados por un proceso de aglomeración o extrusión. Habitualmente, las croquetas se producen para dar un alimento para mascotas seco y semihúmedo, preferiblemente un alimento seco para mascotas. Los trozos pueden variar en tamaño y forma en función del proceso o equipo. Por ejemplo, las croquetas pueden ser esféricas, cilíndricas, ovaladas o de forma similar. Pueden tener una dimensión máxima de menos de aproximadamente 2 cm, por ejemplo.

La expresión «productos X con trozos» se refiere en la presente memoria a todos los alimentos comestibles que comprenden trozos en una preparación (siendo dicha preparación la «preparación X»). Ejemplos clásicos de estos son productos con trozos en gelatina, productos con trozos en salsa y otros. Esta categoría de «productos X en trozos» también incluye formas comestibles distintas de los trozos que pueden estar contenidos en la preparación X, tales como gelatina, salsa y similares. Por ejemplo, otras formas distintas a los trozos pueden ser productos rebanados, productos triturados, etc.

El término «paté» tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los alimentos comestibles obtenidos en forma de productos húmedos y comprenden terrinas, patés, mousses y otros.

El término «golosina» (o «galleta») se refiere a cualquier alimento que está diseñado para que el dueño se lo de a su mascota, preferiblemente en un momento diferente a las comidas, para contribuir, promover o mantener un proceso de vinculación entre mascota y dueño. Las golosinas o las galletas no suelen ser aptos para proporcionar un «alimento completo». Ejemplos de golosinas para perros son los huesos. Ejemplos de golosinas para gatos son las almohadillas masticables y los palitos masticables.

En particular, el hidrolizado de proteínas de la invención se puede añadir a dicha composición de alimento para mascotas mediante recubrimiento o mediante inclusión, preferiblemente mediante inclusión.

«Recubrimiento» significa deposición tópica del hidrolizado de la invención, es decir, deposición sobre la superficie del alimento para mascotas, por ejemplo, mediante pulverización, atomización, etc. El hidrolizado de proteínas de la invención se puede añadir a un alimento para mascotas mediante el recubrimiento, habitualmente en una mezcla con uno o más potenciadores de la palatabilidad y/o grasa.

El término «inclusión» como se utiliza en la presente descripción se refiere a la adición del hidrolizado de la invención en el núcleo del alimento para mascotas. Por ejemplo, la inclusión de dicho hidrolizado en un alimento para mascotas se puede lograr mezclándolo con otros ingredientes del alimento para mascotas, antes de las etapas de procesamiento adicionales, para obtener el producto alimenticio para mascotas final (que comprende el tratamiento térmico y/o la extrusión y/o la autoclave, etc.).

En particular, el alimento comprende entre un 0.1 % y un 20 %, preferiblemente entre un 0.1 % y un 10 % en peso de dicho hidrolizado.

Según esta realización, el hidrolizado de proteínas está presente en un alimento en cantidad suficiente para proporcionar una cantidad de péptidos (proteínas solubles en agua de peso molecular menor que 1000 Da) comprendida entre 0.05 g y 10 g/100 g de alimento, especialmente entre 0.05 g y 5 g/100 g de alimento.

Dicho hidrolizado de proteínas también está presente en la composición alimenticia de la invención en cantidad suficiente para proporcionar una cantidad de fosfolípidos comprendida entre 0.25 mg y 200 mg/100 g de alimento, especialmente entre 0.25 mg y 150 mg/100 g de alimento.

Dicho hidrolizado de proteínas también está presente en la composición alimenticia de la invención en cantidad suficiente para proporcionar una cantidad de DHA y EPA comprendida entre 0.5 mg y 150 mg/100 g de alimento, especialmente entre 0.5 mg y 100 mg/100 g de alimento.

Así, dicho hidrolizado de proteínas está presente en la composición alimenticia de la invención en una cantidad suficiente para permitir, en base a una dosis diaria, una ingesta diaria de dicho hidrolizado de entre 0.02 gramos (g) y 2 g, preferiblemente entre 0.02 g y 1 g por kilogramo de peso vivo del animal.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un *kit* que comprende, en un solo empaque, varios contenedores:

- a) al menos un hidrolizado de proteínas como se definió anteriormente;
- b) al menos DHA.

Según una realización particular de la invención, dicho *kit* comprende, además:

- c) uno o más ingredientes alimenticios para mascotas, preferiblemente elegidos del grupo que consiste en proteínas, péptidos, aminoácidos, cereales, glúcidos, materias grasas o lípidos, nutrientes, potenciadores de la palatabilidad, digestatos animales, harina de carne, gluten, conservantes, agentes tensioactivos, agentes texturizantes, agentes estabilizantes, colorantes, compuestos inorgánicos de fosfato, saborizantes y/o

condimentos.

Según otra realización de la invención, dicho *kit* comprende, en un único empaque, varios contenedores:

a) al menos un hidrolizado de proteínas como se definió anteriormente;

5 b) uno o más ingredientes alimenticios para mascotas, preferiblemente elegidos del grupo que consiste en proteínas, péptidos, aminoácidos, cereales, glúcidos, materias grasas o lípidos, nutrientes, potenciadores de la palatabilidad, digestatos animales, harina de carne, gluten, conservantes, agentes tensioactivos, agentes texturizantes, estabilizantes, colorantes, compuestos inorgánicos de fosfato, saborizantes y/o condimentos.

c) opcionalmente al menos DHA.

10 Los *kits* particulares según la presente invención comprenden además medios para comunicar información o instrucciones, para ayudar en la utilización de los elementos del *kit*. Dichos medios de comunicación de información o instrucciones son, por lo tanto, un elemento opcional del *kit*.

«Contenedores» comprende, entre otros, bolsas, cajas, cartones, botellas, envolturas de cualquier tipo, forma o material, envolturas, envolturas retráctiles, componentes apilados o asegurados de cualquier otra manera o sus combinaciones, que se utilizan para almacenar materiales.

15 La expresión «empaque único» o «un solo empaque» significa que los componentes de un *kit* están físicamente asociados en uno o más contenedores o con uno o más contenedores y se consideran una unidad para su fabricación, distribución, venta o utilización. Un empaque único puede consistir en contenedores de componentes individuales asociados físicamente de modo que se consideren una unidad para su fabricación, distribución, venta o utilización.

20 Como se utiliza en la presente descripción, la expresión «medio de comunicar información o instrucciones» es un componente del *kit* en cualquier forma adecuada para proporcionar información, instrucciones, recomendaciones y/o garantías, etc. Estos medios pueden comprender un documento, un medio de almacenamiento digital, un medio de almacenamiento óptico, una presentación de audio, una pantalla que contiene información. Los medios de comunicación se pueden mostrar en un sitio web, un folleto, una etiqueta de producto, un folleto de empaque, un anuncio, una pantalla visual, etc.

25 *Composición farmacéutica*

Según otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un hidrolizado de proteínas según la invención, y como se ha definido anteriormente, un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 La composición farmacéutica de la invención se puede administrar sistémicamente, por ejemplo, por vía oral, parenteral y, en algunos casos, incluso por vía transdérmica. Cada una de estas formas de administración se adaptará más o menos a la situación real del sujeto que necesita este tratamiento.

«Sujeto» significa un mamífero, un ser humano o un animal, preferiblemente un ser humano o una mascota, preferiblemente un ser humano, un perro o un gato, macho o hembra, preferiblemente mayor y en riesgo de desarrollar deterioro cognitivo relacionado con la edad.

35 En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención se administra por vía oral.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención tiene forma de polvo que comprende al menos un hidrolizado de proteínas según la invención.

En forma de polvo, la composición farmacéutica de la invención puede empacarse como cápsulas, pastillas para chupar, sobres, comprimidos, especialmente comprimidos solubles o efervescentes para la administración oral.

40 En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención se empaqueta como cápsulas para tragar.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica de la invención se empaqueta en sobres en forma de polvo para disolver.

La presente invención se refiere además a productos que comprenden un hidrolizado de proteínas según la invención y DHA como un producto combinado para utilización simultánea, separada o escalonada como medicamento.

45 El producto combinado puede, según otras realizaciones, utilizarse especialmente como agente neuroprotector y/o para prevenir y/o tratar la neuroinflamación y/o en el tratamiento o la prevención de trastornos cognitivos leves relacionados con la edad y/o para prevenir y/o limitar los trastornos de ansiedad y/o prevenir y/o limitar el estrés y/o prevenir y/o tratar los trastornos de la memoria y/o mejorar y/o promover el aprendizaje espacial, preferiblemente relacionado con el envejecimiento.

50 En el contexto de la presente invención, la expresión «administración simultánea» significa que el hidrolizado de

proteínas y el DHA se administran juntos en una sola composición farmacéutica y/o alimenticia.

En el contexto de la presente invención, la expresión «administración separada» significa que el hidrolizado de proteínas y el DHA se administran al mismo tiempo por medio de dos o más composiciones farmacéuticas y/o alimenticias distintas.

- 5 En el contexto de la presente invención, el término «escalonado» significa que el hidrolizado de proteínas y el DHA se administran sucesivamente por medio de dos o más composiciones farmacéuticas y/o alimenticias distintas.

Cuando el hidrolizado de proteínas y el DHA se administran secuencialmente, pueden administrarse dentro de un intervalo de 0 a 120 minutos, especialmente de 0 a 60 minutos, preferiblemente de 0 a 30 minutos y más preferiblemente de 0 a 5 minutos.

10 *Utilización terapéutica*

Sorprendentemente, los autores pudieron demostrar que el hidrolizado de proteínas según la invención (o hidrolizado puro en forma de polvo), como se describió anteriormente, posee virtudes protectoras contra los trastornos cognitivos leves relacionados con la edad, especialmente para prevenir y/o limitar los trastornos de ansiedad, para prevenir y/o limitar el estrés, para prevenir y/o tratar trastornos de la memoria, y para mejorar y/o promover el aprendizaje espacial.

15 Así, los autores pudieron demostrar que el hidrolizado de proteínas de la invención tenía, en particular, un efecto neuroprotector y un efecto antineuroinflamatorio.

Así, otro objetivo de la invención se refiere a un hidrolizado de proteínas según la invención o una composición farmacéutica que lo contiene, para su utilización como un medicamento.

- 20 Dicha utilización como un medicamento puede ser una utilización como agente neuroprotector y/o una utilización para prevenir y/o tratar la neuroinflamación y/o una utilización en el tratamiento o la prevención de trastornos cognitivos leves relacionados con la edad y/o una utilización para prevenir y/o limitar los trastornos de ansiedad y/o prevenir y/o limitar el estrés y/o prevenir y/o tratar los trastornos de la memoria y/o mejorar y/o promover el aprendizaje espacial, preferiblemente relacionados con la edad.

- 25 La invención se refiere además a un hidrolizado de proteínas según la invención o una composición farmacéutica que lo contiene, para su utilización como agente neuroprotector.

La invención también se refiere a un hidrolizado de proteínas según la invención o una composición farmacéutica que lo contiene, para su utilización en la prevención y/o el tratamiento de la neuroinflamación.

La invención también se refiere a un hidrolizado de proteínas según la invención o una composición farmacéutica que lo contiene, para su utilización en el tratamiento o la prevención de trastornos cognitivos leves relacionados con la edad.

- 30 La invención también se refiere a un hidrolizado de proteínas según la invención o una composición farmacéutica que lo contiene, para su utilización en la prevención y/o el tratamiento de trastornos relacionados con la edad, la prevención y/o la limitación de los trastornos de ansiedad, la prevención y/o la limitación del estrés, la prevención y/o el tratamiento de trastornos de la memoria, mejorar y/o promover el aprendizaje espacial.

- 35 El término «medicamento» como se utiliza en la presente memoria se refiere tanto a un producto para uso humano como a un producto veterinario para uso en mascotas. El medicamento puede administrarse de muy diferentes formas en función de su modo de acción y de su capacidad de absorción por parte del sujeto al que se le administra. Por lo tanto, un medicamento puede administrarse, por ejemplo, por vía tópica en forma de formulaciones de unción, como champús, duchas, inmersiones, baños o pulverizaciones, como collares para animales y en muchas variaciones de estas formas de aplicación. También se puede administrar por vía sistémica, por ejemplo, por vía oral, parenteral y,
- 40 en algunos casos, incluso por vía transdérmica. Cada una de estas formas de administración se adaptará más o menos a la situación real y a la mascota o persona que necesite este tratamiento.

- «Tratamiento» significa disminuir el deterioro cognitivo leve relacionado con la edad. Tal disminución puede demostrarse a través de un análisis que muestra una disminución de los trastornos de ansiedad y/o estrés y/o trastornos de la memoria y/o una mejora en el aprendizaje espacial. Ventajosamente, el tratamiento elimina completamente el deterioro cognitivo leve relacionado con la edad, pero el término «tratamiento» incluye cualquier disminución significativa de dicho deterioro. En el contexto del tratamiento de los trastornos cognitivos leves relacionados con la edad, la composición según la invención puede combinarse con otro tratamiento habitual de los trastornos cognitivos leves relacionados con la edad bien conocidos por el experto en la técnica.
- 45

- 50 «Profilaxis» significa disminuir la probabilidad de deterioro cognitivo leve relacionado con la edad. No obstante, el término «profilaxis» también cubre la posibilidad de disminuir significativamente la frecuencia de aparición de deterioro cognitivo leve relacionado con la edad en una población de sujetos que ingieren una cantidad efectiva del hidrolizado de proteínas según la invención durante el tiempo de ingesta, en comparación con una población de sujetos similares que no toman el hidrolizado de proteínas según la invención (en cuyo caso la probabilidad de deterioro cognitivo leve relacionado con la edad durante la ingesta del hidrolizado de proteínas de la invención simplemente disminuye

significativamente). Para la comparación, las poblaciones que se comparan deben ser similares, especialmente con respecto a la proporción de sujetos en riesgo de deterioro cognitivo leve relacionado con la edad.

Así, la administración oral de las composiciones de la invención es particularmente ventajosa en el caso de la profilaxis de trastornos cognitivos leves relacionados con la edad. De hecho, la administración regular por vía oral del hidrolizado de la invención permite prevenir la inflamación y luego mantener un bajo nivel de inflamación en las células microgliales y neuronales a largo plazo, especialmente en el hipocampo.

La invención se relaciona además con la utilización de un hidrolizado de proteínas, o una composición farmacéutica que lo contiene, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis del deterioro cognitivo leve relacionado con la edad.

Ventajosamente, dicho hidrolizado de proteínas es como se describió anteriormente.

El hidrolizado de la invención se puede utilizar en un método para tratar profiláctica o terapéuticamente el deterioro cognitivo leve relacionado con la edad que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de un hidrolizado de proteínas, o una composición farmacéutica que lo contenga.

El hidrolizado de la invención se puede utilizar en un método para tratar profiláctica o terapéuticamente el deterioro cognitivo leve relacionado con la edad que comprende la administración simultánea, separada o escalonada a un sujeto que necesite una cantidad efectiva de productos que contengan un hidrolizado de proteínas y DHA, como un producto combinado.

En el presente método de tratamiento, dicho hidrolizado de proteínas es como se describió anteriormente.

Una «cantidad efectiva» de un hidrolizado de proteínas o composición farmacéutica que lo contiene, tal como se utiliza en la presente memoria, es una cantidad de hidrolizado de proteínas o composición farmacéutica que lo contiene proporcionada por una vía de administración particular y según un modo de administración particular, que es suficiente para lograr un efecto deseado terapéutico y/o profiláctico como se definió anteriormente. La cantidad de hidrolizado de proteínas o composición farmacéutica que lo contiene administrada al sujeto dependerá del tipo y la gravedad de la enfermedad, el tipo, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración y velocidad de eliminación del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los medicamentos utilizados en combinación o concomitantemente con el hidrolizado o la composición farmacéutica que lo contiene; y factores similares bien conocidos en la técnica médica. El experto en la técnica sabrá determinar las dosis adecuadas en función de estos y otros factores. Por ejemplo, es bien conocido por el experto en la técnica comenzar con dosis del compuesto en concentraciones inferiores a las necesarias para lograr el efecto terapéutico y/o profiláctico deseado y aumentar progresivamente la dosis hasta lograr el efecto deseado.

La presente invención se describirá en detalle con referencia a los siguientes ejemplos, que se presentan únicamente con fines ilustrativos y no limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

Los hidrolizados ilustrados más abajo conforme a la presente invención son hidrolizados en polvo puros como se describió anteriormente.

Ejemplo 1: Material y métodos

1.1. Cultivos celulares

BV2

Las células BV2 se derivan de una estirpe celular microglial murina neonatal inmortalizada por el sistema raf/mycet, proporcionado por el Dr. Watterson (NorthWestern University, EE. UU.). Se cultivaron en medio completo que contenía RPMI-Glutamax con glutamina 2 mM (Invitrogen, Life Technologies, Francia) suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10 % y penicilina al 1 % (100 U/ml)-estreptomicina (100 µg/ml; Sigma- Aldrich, Francia) en una atmósfera húmeda con el 5 % de CO₂ a 37 °C, como describieron De Smedt-Peyrusse et al. (8).

Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80 % al 90 %, se trataron durante 24 horas con:

- DHA a la concentración de 16 µM (Sigma-Aldrich, Francia). Esta concentración de DHA se validó en el laboratorio como dosis efectiva para demostrar un efecto antiinflamatorio;
- proporcionando el hidrolizado según la invención 16 µM de DHA.

A continuación, las células se trataron durante 2 h, 6 h o 24 h con 1 µg/ml de LPS (lipopolisacáridos) (Sigma-Aldrich) para inducir estrés inflamatorio y luego se recolectaron en Trizol (n = 6; Invitrogen, Life Technologies).

Cocultivo

Con el fin de tener un modelo más complejo, se realizó un cocultivo denominado «sándwich» entre células neuronales (HT22) y células microgliales (BV2). En una primera fase, los dos tipos de células se cultivaron por separado. Las células HT22 se derivaron de una estirpe celular de hipocampo de ratón, proporcionada por el Dr. E. Maronde (Alemania). Se cultivaron en medio completo que contenía DMEM (Invitrogen, Life Technologies) suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10 % y penicilina al 1 % (100 U/ml)-estreptomicina (100 µg/ml; Sigma-Aldrich) en una atmósfera húmeda con el 5 % de CO₂ a 37 °C.

Se cultivó BV2 en medio completo RPMI en placas simples de 6 pocillos y HT22 en medio completo DMEM en cubreobjetos. Después de 24 horas de cultivo, las HT22 se devolvieron a la estera microglial para tratar ambas estirpes celulares durante 16 horas con el hidrolizado según la invención que proporcionó 16 µM de DHA.

A continuación, las células se trataron durante 6 h con 1 µg/ml de LPS para inducir estrés inflamatorio y se recolectaron por separado (n = 5).

1.2. Animales y tratamientos

Todos los experimentos se realizaron en ratones macho C57Bl/6J (enero) de 7 semanas y 12 meses de edad.

Los ratones se colocaron en jaulas individuales para monitorear su ingestión de alimentos y aumento de peso. Durante 12 semanas, se alimentaron *ad libitum* con una dieta deficiente en PUFA n-3 que imitaba las deficiencias de PUFA n-3 relacionadas con la edad. Al final de este período, los animales se suplementaron con el hidrolizado.

Para el hidrolizado de H1, los animales se dividieron en 4 grupos, suplementados o no:

- Blanco joven (n = 12), que recibieron la dieta deficiente en PUFA n-3.
- Blanco mayor (n = 12), que recibieron la dieta deficiente en PUFA n-3.
- H1 joven (n = 12), que recibieron el hidrolizado de H1 según la invención.
- H1 mayor (n = 12), que recibieron el hidrolizado de H1 según la invención.

Tabla 1: Hidrolizado H1

[Tabla 1]

g/kg de dieta	Dieta de blanco	Dieta H1
Hidrolizado de H1 según la invención	-	200
<i>Péptidos</i>	-	140
<i>DHA</i>	-	3.05

Para el hidrolizado de H2, los animales se dividieron en 6 grupos, suplementados o no:

- Blanco joven (n = 12), que recibieron la dieta deficiente en PUFA n-3.
- Blanco mayor (n = 13), que recibieron la dieta deficiente en PUFA n-3.
- H2 joven (n = 12), que recibieron el hidrolizado de H2 según la invención.
- H2 mayor (n = 13), que recibieron el hidrolizado de H2 según la invención.
- H2 joven + DHA (n = 12), que recibieron el hidrolizado de H2 según la invención enriquecido con DHA.
- H2 mayor + DHA (n = 13), que recibieron el hidrolizado de H2 según la invención enriquecido con DHA.

Tabla 2: Hidrolizado H2

[Tabla 2]

g/kg de dieta	Dieta de blanco	Dieta H2	Dieta H2 + DHA
Hidrolizado de H2 según la invención	-	1.66	1.66
Péptidos	-	1.11	1.11
DHA	-	0.029	0.0352
DHA (Polaris)	-	-	2

Después de 6 semanas de suplementación, todos los ratones se sometieron a pruebas de comportamiento para evaluar sus capacidades cognitivas y su reactividad al estrés. Al final de estos protocolos, se sacrificó a los animales y se recolectaron las estructuras de interés, incluido el hipocampo. El efecto de la suplementación sobre la expresión de factores inflamatorios y neurotróficos se determinó mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

El estudio de inflamación aguda se realizó en ratones macho C57Bl/6J (enero) de 7 semanas de edad.

Los ratones se pusieron en grupos de 6 en jaulas colectivas, con acceso a agua *ad libitum* y dieta estándar (dieta A04, Safe, Augy, Francia) y luego forzada mediante un tubo gástrico durante 18 días (Ecimed, Boissy-Saint-Léger, Francia). Los ratones se dividieron en 3 grupos, suplementados o no:

- Control (n = 11), que recibieron 100 µl de agua + 50 µl de aceite de maní
- H2 (n = 10), que recibieron 100 µl de hidrolizado de H2 + 50 µl de aceite de maní
- DHA (n = 12), que recibieron 100 µl de agua + 50 µl de DHA (Polaris, Quimper, Francia)

Tabla 3: Sonda de hidrolizado de H2

	Blanco	H2	DHA
Agua (µl/día)	100	-	100
Aceite de maní (µl/día)	50	50	-
Hidrolizado de H2 según la invención (µl/día)	-	100	-
Péptidos (mg/día)	-	5.5	-
DHA (mg/día)	-	0.143	-
DHA (µl/día)(10 mg/día*)	-	-	50

*: dosis efectiva comprobada para el efecto cognitivo

Después de 18 días de suplementación, a los ratones se les inyectó vía intraperitoneal 125 µg/kg de LPS (*Escherichia coli*, 0127: B8, Sigma-Aldrich, Lyon, Francia) (Rey et al., 2019 (9); Mingam et al., 2008 (10)) para inducir una reacción inflamatoria o inyección de una solución salina (0.9 % de NaCl). Dos horas después de la inyección, se sacrificó a los ratones y se recolectaron las estructuras de interés, incluido el hipocampo.

1.3. Pruebas de comportamiento

1.3.1. Laberinto en Y

6 semanas después del inicio de la suplementación, se evaluó la memoria de reconocimiento espacial dependiente del hipocampo mediante la utilización del laberinto en Y como describen Labrousse et al., (11) y Moranis et al., (12). Esta prueba de memoria espacial dependiente del hipocampo se basa en la curiosidad de los roedores y su capacidad para distinguir un entorno nuevo de uno familiar. Permite así una evaluación de la memoria espacial ligada al hipocampo. Esta prueba se realiza en un laberinto en forma de Y con 3 brazos (35 cm de largo y 10 cm de profundidad), iluminado a 15 lux. Se disponen instrucciones visuales en las paredes, lo que permite a los ratones encontrar su camino dentro del espacio.

Primero, el animal se colocó en un brazo de salida y se enfrentó a los otros dos brazos, uno de los cuales estaba

cerrado. Tenía 5 minutos para explorar los dos brazos abiertos y luego se volvió a colocar en su jaula durante 1 hora. Durante la fase de restitución, el animal se volvió a colocar en el laberinto durante 5 minutos, pero esta vez con los 3 brazos abiertos. Debido a su fuerte comportamiento exploratorio, los animales explorarían preferiblemente el nuevo brazo. Los animales que exploraron aleatoriamente los 3 brazos tenían problemas de memoria.

- 5 Los animales se filmaron y se siguieron por video (*software* SMART, Bioseb) para analizar el tiempo (minutos) de permanencia en los diferentes brazos. Así mismo, se calculó un índice de reconocimiento para comparar el rendimiento de los animales frente al azar (33 %): tiempo pasado en el brazo nuevo / (tiempo pasado en el brazo nuevo + tiempo pasado en el brazo familiar + tiempo pasado en el brazo inicial).

1.3.2. «Campo abierto»

- 10 7 semanas después del comienzo de la suplementación, se evaluó el comportamiento similar a la ansiedad de los animales mediante la utilización de la prueba de «campo abierto». Esta prueba se basa en la aversión que produce un entorno desconocido y abierto. La prueba se realizó mediante la utilización de un dispositivo opaco (25 cm de ancho, 45 cm de largo y 40 cm de profundidad) iluminado a 30 lux. El dispositivo estaba virtualmente dividido en dos partes: la parte central considerada como ansiolítica y la parte periférica considerada como menos ansiolítica. Los
15 animales eran libres de explorar el campo abierto durante 10 minutos, se filmaron y se siguieron por video (*software* SMART, Bioseb) para medir el tiempo que pasaban (minutos) en las diferentes áreas.

1.3.3. Laberinto acuático de Morris

- 20 7 semanas después del inicio de la suplementación, se evaluaron las habilidades de aprendizaje y memoria espacial mediante la utilización del laberinto acuático de Morris (13). El protocolo experimental utilizado para este estudio implica más particularmente la memoria de referencia espacial dependiente del hipocampo.

El protocolo utilizado es el descrito por Bensalem et al. (14). Consta de 4 fases:

- Familiarización: permite que los ratones se familiaricen con la natación y luego se suban a una plataforma en un estanque (60 cm de diámetro), durante 2 días (días 1 y 2).
- 25 ▪ Aprendizaje indexado: realizado en el 3^{er} día, permite la evaluación de los déficits motores y visuales y la acentuación de la familiarización. Los animales deben encontrar una plataforma submarina marcada.
- Aprendizaje de referencia espacial: los animales deben aprender a encontrar la plataforma sumergida no visible mediante la utilización de señales espaciales visuales (días 4 a 7). Para ello, los ratones tienen 6 ensayos/día (punto de corte de 90 s) durante 4 días consecutivos. La velocidad de nado, la latencia para llegar a la plataforma, la distancia y la trayectoria recorrida por los animales para cada ensayo se registraron por un sistema de video-seguimiento (Imetronic).
30

1.3.4. La prueba de la sonda

- 35 En esta prueba se evalúa la memoria espacial. 72 horas después del último día de entrenamiento, se retira la plataforma de la piscina y se coloca al animal en la piscina durante 60 segundos. Los animales se siguieron por video (*software* SMART, Bioseb) para medir el tiempo empleado (segundos) y la distancia recorrida (cm) en el cuadrante «diana», es decir, el cuadrante donde se encontraba la plataforma durante la fase de aprendizaje espacial.

1.3.5. Análisis de estrategias de aprendizaje

- 40 Para cada ensayo durante el aprendizaje espacial, las trayectorias de natación se analizaron mediante la utilización de la reproducción del programa de video-seguimiento Imetronic. Las estrategias de búsqueda en la plataforma se clasificaron a ciegas y luego se asignaron para cada prueba mediante la utilización de un esquema de clasificación similar a los desarrollados previamente para otros estudios (15, 16, 17). Estas estrategias se dividieron en dos categorías principales: estrategias no espaciales y estrategias espaciales.

- 45 Las estrategias no espaciales constan primero de estrategias de «búsqueda global»: «búsqueda periférica» (el animal nada preferiblemente en un área de 15 cm alrededor de los bordes de la piscina), «búsqueda al azar» (búsqueda en toda la piscina que cubre >75 % de la superficie), «búsqueda circular» (el ratón hace pequeños círculos y puede hacer algunos movimientos bruscos en direcciones determinadas). A continuación, están las estrategias de «búsqueda local»: el «barrido» (el animal busca en un área limitada, a menudo en el centro, de la piscina que cubre entre el 15 % y el 75 % de la superficie), el «bucle» (el ratón nada en una forma circunferencial a una distancia bastante fija, superior a 15 cm, de los bordes), la «repetición incorrecta» (el animal nada en una dirección precisa que no corresponde a la posición de la plataforma y repite la misma trayectoria varias veces), y finalmente el «enfoque incorrecto» (el animal busca intensamente en una pequeña porción de la piscina que no contiene la plataforma).
50

Las estrategias espaciales constan de las estrategias «correcta repetida» (donde el animal nada en la dirección de la plataforma y luego repite la misma trayectoria varias veces), «espacial indirecta» (el animal nada indirectamente hacia la plataforma, posiblemente efectuando uno o dos bucles), «espacial directa» (el ratón nada directamente hacia la plataforma), y «enfoque correcto» (el animal nada y luego busca intensamente en el cuadrante donde se encuentra la

plataforma).

1.3.6. Reactividad al estrés

5 La reactividad al estrés se evaluó 10 semanas después del inicio de la suplementación. Para ello, los animales se sometieron a una prueba de sujeción de 30 minutos. Se tomó una muestra de sangre de la mejilla de la vena mandibular al inicio de la prueba (T0), luego a los 30 minutos (T30) y 60 minutos (T60) después del inicio de la prueba. Los ratones se sacrificaron 90 minutos (T90) después de la prueba y se realizó una punción intracardiaca para obtener una muestra de sangre.

1.4. Análisis bioquímicos

1.4.1. Medición de las tasas de corticosterona en plasma

10 El plasma se aisló de la sangre por centrifugación a 3000 g durante 20 minutos. A partir del plasma se realizó una determinación de corticosterona total mediante la utilización del ELISA DetectX® «Corticosterone, Enzyme Immunoassay Kit» según las instrucciones del fabricante (Arbor Assay). La concentración de corticosterona (ng/ml) de cada muestra se calculó en base al estándar espectrofotométrico.

1.4.2. Expresión génica

15 La expresión de los diferentes genes de interés se evaluó mediante PCR cuantitativa en tiempo real como describieron Rey et al. (18). Estos análisis se realizaron en células BV2 y HT22 y en el hipocampo.

1.4.3. Extracción de ARN total

20 El ARN total se extrajo de células e hipocampos mediante la utilización del protocolo de extracción de reactivos TRIzol (Invitrogen, Life Technologies) que contenía fenol e isotiocianato de guanidina. Este reactivo permite, después de la lisis y adición de cloroformo, separar una fase acuosa superior que contiene ARN de una fase orgánica que contiene ADN y proteínas. Tras la recuperación de la fase acuosa, el ARN se precipitó con glucógeno (20 mg/ml) e isopropanol. Después de lavados sucesivos con etanol al 70 %, el sedimento de ARN se secó y luego se recuperó en 10 µl de agua estéril. La pureza y la cantidad de ARN en cada muestra se midió espectrofotométricamente (Nanodrop, Life Technologies).

25 1.4.4. Transcripción inversa

La transcripción inversa (RT) se realizó con 1 µg o 2 µg de ARN, según la cantidad obtenida, para sintetizar ADN complementario (ADNc). Los ARN se incubaron a 37 °C durante 15 minutos y luego a 75 °C durante 1 minuto con una mezcla de tampón de ADNasa, ARNasa, ADNasa I (Invitrogen, Life Technologies). Se realizó una segunda incubación a 65 °C durante 5 minutos en presencia de cebadores aleatorios (150 ng/µl, Invitrogen) y dNTP 10 mM. Finalmente, se añadió una mezcla de tampón 5X, DTT, ARNasa OUT a 40 U/µl y Superscript III a 200 U/µl (Invitrogen, Life Technologies). La mezcla de reacción se incubó a 25 °C durante 5 minutos, luego a 50 °C durante 50 minutos y a 70 °C durante 15 minutos. La concentración final de ADNc obtenida fue de 50 ng/µl (si 1 µg de ARN inicial) o 100 ng/µl (si 2 µg de ARN inicial).

1.4.5. PCR cuantitativa en tiempo real

35 Los ADNc de la reacción de RT se amplificaron selectivamente mediante la utilización de cebadores específicos para las secuencias de los genes diana en estudio. El gen de referencia utilizado en la presente memoria es la β-actina, y los genes diana estudiados para el cocultivo son: IL-6, IL-1β, TNF-α, BDNF y NGF.

40 Para el estudio de la inflamación crónica se amplificaron los siguientes genes diana: en hipocampo IL-6, IL-1β, TNF-α, CD11b e Iba1, y en hipotálamo: CrhR1, CRHBP, HSD11b1. Para el estudio de la inflamación aguda, se amplificaron los siguientes genes diana para los hipocampos: IL-6, IL-1β, TNF-α, COX-2, BDNF y NGF.

45 Para cada muestra, se adicionaron 2 µl de ADNc a 20 ng/µl a 8 µl de una mezcla que comprendía Taq polimerasa (5X), pares de oligonucleótidos del gen diana (2X) y agua estéril (1X). A continuación, la placa se colocó en un termociclador Light Cycler (LC 480 versión 2, Roche) para realizar el programa de PCR: una fase de activación (2 minutos a 95 °C) y 50 ciclos de amplificación, comprendiendo cada uno una fase de desnaturalización (15 segundos a 95 °C), y una fase de hibridación y elongación de oligonucleótidos (1 minuto a 60 °C).

La cuantificación final se realizó mediante la utilización del método comparativo del «umbral del ciclo» (Ct). Para cada gen diana y cada muestra, la tasa de transcripto se normalizó con la tasa de transcripto del gen de referencia (β-actina).

1.4.6. Tarjeta de biomarcadores

50 Los ADNc de la RT se diluyeron (1.3 µl, 5 ng/µl) y luego se añadieron al reactivo de carga de muestras de tinte de unión de ADN (Fluidigm), EvaGreen (Interchim, Montluçon, Francia) y el tampón Tris-EDTA (TE) con bajo contenido de EDTA para constituir la placa de muestra. En la placa Mix, se añadieron 10 µl de pares de cebadores (100 µM) al

reactivo de carga del ensayo (Fluidigm) y al tampón TE con bajo contenido de EDTA para obtener una concentración final de 5 μ M. Después de activar el chip en el mando de circuito fluido integrado, la mezcla de la muestra (5 μ l) y la mezcla del ensayo (5 μ l) se cargaron en los pozos de entrada de la muestra. Uno de los pozos se rellenó con agua para monitorear la contaminación. Para verificar la amplificación de objetivos diana y la eficiencia del proceso de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), se procesó, preamplificó y cuantificó una muestra de blanco (ADNg de ratón, ThermoFisher, Waltham, EE. UU.) en un ensayo de blanco (tubo RNasePTaqMan, ThermoFisher) mediante la utilización del mismo proceso en la misma placa al mismo tiempo. El chip se insertó en el control de IFC, en el que se mezclaron 6.3 nl de mezcla de muestra y 0.7 nl de Mix. La PCR en tiempo real se realizó mediante la utilización del sistema de biomarcadores (Fluidigm) en la plataforma GenoToul (Toulouse, Francia) con el siguiente protocolo: mezclado térmico a 50 °C, 2 min; 70 °C, 30 minutos; 25 °C, 10 min, Uracil-DNA N-glicosilasa (UNG) a 50 °C, 2 min, activación a 95 °C, 10 min, ciclo de PCR de 35 ciclos a 95 °C, 15 s; 60 °C, 60 s y curvas de fusión (de 60 °C a 95 °C). Los resultados se analizaron mediante la utilización del programa de análisis de PCR en tiempo real Fluidigm v.4.1.3. (San Francisco, EE. UU.) para monitorear la amplificación específica de cada cebador. A continuación, los datos de qPCR sin procesar se analizaron mediante la utilización del programa GenEx (MultiD analysis AB, Freising, Alemania) para seleccionar el mejor gen de referencia, en este caso β -actina, para la normalización de la expresión de ARNm y para medir la expresión relativa de cada uno de los 46 genes analizados.

1.4.7. Expresión de proteínas

El inmunoelectrotransferencia permite la detección de proteínas diana mediante la utilización de anticuerpos dirigidos contra estas proteínas. Las muestras se diluyeron con agua libre de ARNasa a una concentración de 1 μ g/ μ l en 200 μ l. Se tomó un volumen de 50 μ l de cada muestra y se añadieron 12.5 μ l de tampón de carga. A continuación, las muestras se calentaron a 75 °C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas.

La electroforesis SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes solo permite la migración de proteínas en un campo eléctrico en función de su peso molecular. El gel de poliacrilamida se vertió y luego se recubrió con un tampón de migración que permitió la migración de proteínas. Las muestras, junto con un marcador de tamaño, se depositaron en los pozos de gel y migraron a 90 V durante 30 minutos y 130 V durante 1 hora. Para detectar las proteínas, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (75 V durante 1.5 horas con tampón de transferencia). Para verificar que la transferencia funcionaba correctamente, las membranas se tñieron con rojo Ponceau y luego se enjuagaron. Los sitios no específicos se bloquearon mediante incubación en TBS al 0.05 % / Tween-20 (TBST) y leche al 5 % (leche desnatada Régilait) durante 1 hora para evitar interacciones entre la membrana y el anticuerpo. Después de enjuagar con TBST, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C en BSA al 5 %, azida de sodio al 1 % con los siguientes anticuerpos primarios: anti-GAPDH, anti-IkB. Después de tres lavados sucesivos con TBST, las membranas se incubaron durante 1 hora con una solución de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de conejo. Después de cinco lavados más con TBST y TBS, las membranas se incubaron durante 5 minutos en una solución de revelador de peroxidasa (SuperSignal West Dura, ThermoFisher, Waltham, EE. UU.). Luego, las proteínas se revelaron mediante la utilización del aparato ChemiDoc MP (Biorad, Hercules, EE. UU.). Se usó la razón de la intensidad de las bandas de la proteína diana con respecto a las bandas de la proteína de referencia (control endógeno, GAPDH) para comparar la expresión relativa de las proteínas.

1.4.8. Análisis de ácidos grasos cerebrales

Se extrajeron los lípidos de la corteza (Folch et al., 1997 (19)) y se transmetilaron los ácidos grasos según el método de Morrison y Smith (Morrison y Smith, 1964). Los ésteres metílicos de ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases en un Hewlett Packard 5890 serie II (Palo Alto, CA, EE. UU.) equipado con un inyector, un detector de ionización de llama (Palo Alto, CA, EE. UU.) y una columna CPSIL-88 (100 m $\times$ 0.25 mm de diámetro interior; espesor de la película, 0.20 μ m; Varian, Les Ulis, Francia). El gas portador era hidrógeno (presión de entrada, 210 kPa). La temperatura del horno se mantuvo a 60 °C durante 5 min, luego se aumentó a 165 °C a 15 °C/min y se mantuvo durante 1 min, luego a 225 °C a 2 °C/min y al final se mantuvo a 225 °C durante 17 minutos. El inyector y el detector se mantuvieron a 250 °C y 280 °C, respectivamente. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se identificaron por comparación con los estándares. La composición de los ácidos grasos se expresó como porcentaje de los ácidos grasos totales.

1.4.9. Cuantificación de oxilipinas

Los diferentes metabolitos derivados del ácido araquidónico (AA), ácido linoleico (LA), DHA y EPA se extrajeron del hipocampo y se analizaron por espectrometría de masas (LC-MS/MS) en la plataforma METATOUL (MetaboHUB, INSERM UMR 1048, I2MC, Toulouse, Francia) como describieron previamente Le Faouder et al. 2013 (20).

1.5. Estadísticas

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas GraphPad Prism y Statistica. Para los análisis de campo abierto, reactividad al estrés y qPCR, los 6 grupos experimentales se compararon mediante ANOVA de 2 factores (edad y dieta) seguido de una prueba post-hoc de Tukey en caso de interacción estadísticamente significativa entre los factores. Para el laberinto en Y, los 6 grupos experimentales se compararon mediante una prueba t de una muestra contra el valor por azar del 33 %. Para el análisis del laberinto acuático de Morris, se analizó la fase de aprendizaje de

los 6 grupos experimentales mediante un ANOVA de medidas repetidas de 3 factores (edad, dieta y día); y la prueba de la sonda se analizó mediante un ANOVA de 1 factor (cuadrantes).

Los datos se expresaron como medias $\pm$ desviación estándar de la media (SEM), y las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p fue menor que 0.05.

5 1.6. Preparación de los hidrolizados

Se obtuvo un hidrolizado de proteínas, H1, mediante el siguiente procedimiento: una solución acuosa que contenía un 50 % de molienda de cabezas de sardina se hidrolizó a 55 °C con alcalasa 2.4 l, durante 2 horas. A continuación, la enzima se inactivó mediante calentamiento a 95 °C durante 30 minutos. Las partículas sólidas (espinas) se eliminaron mediante tamizado. A continuación, se realizó una etapa de centrifugación vertical para retirar el sedimento y la fase grasa (principalmente proteínas insolubles, lípidos neutros [triglicéridos] y materias minerales). Así, la fase acuosa se aisló y se secó.

Se obtuvo un hidrolizado de proteínas, H2, mediante el siguiente proceso: una solución acuosa que contenía un 87 % de molienda de cabezas de sardina se hidrolizó a 55 °C con alcalasa 2.4 l durante 3 horas. A continuación, la enzima se inactivó mediante calentamiento a 95 °C durante 30 minutos. Las partículas sólidas (espinas) se eliminaron mediante tamizado. A continuación, se realizó una etapa de centrifugación vertical para retirar el sedimento y la fase grasa (principalmente proteínas insolubles, lípidos neutros [triglicéridos] y materias minerales). Así, la fase acuosa se aisló y se secó.

1.7. Caracterización de los hidrolizados

Se determinaron varias características de los hidrolizados H1 y H2, como se muestra en la tabla 4.

20 El GH se determinó por (1) el método pH-stat, como describe J. Adler-Nissen (21), así como (2) por el método OPA, como describe Nielsen, P (22).

La humedad se midió según el método del Reglamento CE 152/2009.

La cantidad de proteína total se determinó por el método Dumas, basado en la norma NF EN ISO 16634-1.

25 La cantidad de proteína soluble se determinó mediante la solubilización de la muestra en agua ultrapura, se recuperó la fase acuosa tras la centrifugación y se aplicó el método Kjeldahl (Reglamento CE 152/2009) sobre dicha fase acuosa.

La cantidad de materia mineral se determinó según el método de la norma NF V04-404 de abril 2001.

La cantidad de materia grasa total (o lípidos totales) se determinó según el método del Reglamento CE 152/2009.

30 Las cantidades de lípidos neutros, incluidos los triglicéridos, y de lípidos polares, incluida la fosfatidilcolina, se determinaron mediante HPTLC (cromatografía en capa fina de alta resolución). Las diferentes clases de lípidos neutros y polares se analizaron por separado mediante HPTLC (cromatografía de capa fina de alta resolución) en placas de vidrio (10 cm x 20 cm) impregnadas con sílice 60 (Merck). Se realizó un lavado preliminar de la placa con una mezcla de hexano / éter dietílico (97:3, v/v) en el caso de lípidos neutros, y con una mezcla de acetato de metilo / isopropanol/cloroformo/metanol/KCl (0.25 %) (10:10:10:4:3.6; v:v) en el caso de los lípidos polares, para remover posibles impurezas. A continuación, las placas se activaron a 110 °C durante 30 minutos. Los extractos lipídicos se depositaron en una cantidad adecuada según las muestras mediante un automuestreador (CAMAG). El doble desarrollo permitió la separación de los lípidos neutros. Para la primera migración se usó una mezcla de hexano / éter dietílico / ácido acético (20/5/0.5, v:v:v) y para la segunda migración una mezcla de hexano / éter dietílico (93/3, v:v). Los lípidos polares se separaron tras un único revelado, mediante la utilización de una mezcla de acetato de metilo / isopropanol/cloroformo/metanol/KCl (0.25 %) (10:10:10:4:3.6; v:v) como solvente de elución.

40 Después de la revelación por inmersión de las placas en una solución de ácido cúprico y ácido fosfórico seguido de calentamiento a 120 °C durante 20 minutos, las diferentes clases de lípidos neutros y polares aparecieron como puntos negros. Seis clases de lípidos neutros (alcoholes, ácidos grasos libres, ésteres de esteroles, ésteres de glicéridos, triacilgliceroles y esteroides) y 7 clases de lípidos polares (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, cardiolípidos, aminoetilfosfonato de ceramida y lisofosfatidilcolina) podrían separarse e identificarse por comparación con los estándares. La cuantificación se realizó mediante calibración externa, densitometría mediante la utilización de un escáner ajustado a 370 nm y *software* Wincats (CAMAG).

45 Las cantidades de omega 3 y omega 6, DHA y EPA, plasmalógenos se determinaron como describieron Mathieu-Resuge et al. (23).

Tabla 4: Características de los hidrolizados H1 y H2

[Tabla 4]

	H1	H2
DH (pH-stat) (%)	16.0	12.8
DH (OPA) (%)	32.2	30.3
Humedad (g/100g)	2.6	3.4
Proteínas totales (g/100g)	72.1	69.6
Proteína soluble (g/100g)	70.4	67.0
Materia mineral (g/100g)	9.5	9.0
Grasa total (= lípidos totales) (g/100g)	7.8	10.3
Fosfatidilcolina (mg/g)	10.0	8.9
Omega 3 (mg/g)	26.5	33.8
Omega 6 (mg/g)	3.6	4.5
DHA (mg/g)	13.5	17.3
EPA (mg/g)	6.6	8.4
Plasmalógenos (mg/g)	0.2	0.3
Lípidos neutros (mg/g)	61.6	85.5
Triglicéridos	58	73.6
Lípidos polares (mg/g)	16.4	18.2
EPA	0.9	0.9
DHA	4.9	4.4

El perfil de peso molecular de las proteínas solubles en agua se determinó por cromatografía SEC como describieron F. Guérard et al. (24).

5 Tabla 5. Perfil de peso molecular de proteínas solubles en agua

[Tabla 5]

	H1	H2
>5000 Da	0.4	0.6
(1000-5000) Da	10.7	12.8
(500-1000) Da	14.4	12.9
<500 Da	74.5	73.7

Ejemplo 2: Efecto del hidrolizado *in vitro*

2.1. Efecto del hidrolizado H1 sobre la neuroinflamación de las células microgliales BV2

- 10 Las células microgliales son las células inmunocompetentes del cerebro, responsables de la producción de citocinas. Se indujo estrés inflamatorio en estas células (células BV2) mediante liposacárido (LPS) mediante la utilización del protocolo descrito en el Ejemplo 1.1. Después, se probó la capacidad del hidrolizado de proteínas H1 para disminuir la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6 (interleucina 6), IL-1 β (interleucina 1-beta) y TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), en estas células, según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.4.5.
- 15 Los resultados muestran que, en la condición de control, el LPS induce estrés inflamatorio con alta expresión de IL-6, IL-1 β y TNF- α . El DHA, que presenta capacidades antiinflamatorias, reduce la expresión de IL-6 e IL-1 β inducida por LPS. Sorprendentemente, el tratamiento con hidrolizado de H1 disminuye la expresión de IL-6 e IL-1 β inducida por LPS con un efecto más importante que el de DHA (Figuras 1a y 1b). El hidrolizado H1 también disminuye la expresión de TNF- α (Figura 1c).

2.2. Efecto del hidrolizado H2 sobre la neuroinflamación de las células microgliales BV2

Para imitar un sistema de interacción celular más complejo, el hidrolizado de H2 se probó en un sistema de cocultivo entre células microgliales y células neuronales (BV2-HT22). Se indujo estrés inflamatorio en células microgliales BV2 mediante liposacárido (LPS) mediante la utilización del protocolo descrito en el Ejemplo 1.1. Después, se probó la capacidad del hidrolizado de proteínas H2 de la invención para disminuir la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1 β y TNF- α en estas células, mediante la utilización del protocolo descrito en el Ejemplo 1.4.5.

Los resultados muestran que el LPS induce la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1 β y TNF- α . El hidrolizado de H2 disminuye significativamente la expresión de IL-6 e IL-1 β inducida por LPS 6 horas después del tratamiento (Figura 2).

2.3. Efecto del hidrolizado de H2 en la neuroprotección de las células microgliales BV2

Se probó la capacidad del hidrolizado de proteínas H2 de la invención para promover la neuroprotección en células microgliales en un sistema de cocultivo BV2-HT22 (descrito en el Ejemplo 1.1), especialmente vía un aumento en la expresión del gen BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), factor de crecimiento implicado en la comunicación y homeostasis neuronal, según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.4.5.

Los resultados no muestran ningún efecto de LPS sobre la expresión de BDNF a las 6 h. Por el contrario, el tratamiento con hidrolizado de H2 induce su expresión en condiciones inflamatorias (Figura 2). La suplementación con hidrolizado de H2 facilita el establecimiento de la neuroprotección en condiciones inflamatorias.

En conjunto, los diversos datos obtenidos sobre la expresión de citocinas proinflamatorias y marcadores neurotróficos muestran que el hidrolizado de la invención posee actividades antiinflamatorias y neuroprotectoras.

2.4. Efecto del hidrolizado de H2 en la neuroprotección de las células neuronales HT22

El hidrolizado de proteínas H2 de la invención se probó en cuanto a su capacidad para promover la neuroprotección en células neuronales (células HT22) en un sistema de cocultivo BV2-HT22 (descrito en el Ejemplo 1.1). Así mismo de la expresión de BDNF, también se investigó la expresión del gen del factor de crecimiento nervioso (NGF) mediante la utilización del protocolo descrito en el Ejemplo 1.4.5.

Los resultados muestran que el LPS no tiene efecto sobre la expresión de BDNF y NGF, pero que el tratamiento con el hidrolizado de H2 aumenta su expresión tanto en condiciones de blanco (solución salina) como inflamatorias (LPS), lo que sugiere que el hidrolizado de la invención posee actividad neuroprotectora (Figura 3).

Ejemplo 3: Efecto del hidrolizado *in vivo*

Para estas pruebas *in vivo*, los animales se criaron, se alimentaron y se dividieron en diferentes grupos según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.2.

3.1. Efecto del hidrolizado de H2 en el comportamiento similar a la ansiedad

La respuesta al estrés involucra el eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal (eje HPA). En presencia de estrés, el cerebro secreta cortisol en seres humanos y corticosterona en ratones, hormonas del estrés que influyen en el sistema inmunológico y permiten el retorno a la homeostasis. Una vez que se ha logrado este retorno a la homeostasis, el cortisol actúa por retroalimentación negativa sobre el cerebro para disminuir su propia secreción.

En las personas que sufren de ansiedad, que representa el 10 % de las personas mayores, este eje se interrumpe, lo que provoca daños en el cerebro, especialmente en el hipocampo.

Los efectos de la suplementación con hidrolizado de proteínas según la invención sobre el comportamiento similar a la ansiedad se estudiaron por medio de la denominada prueba de campo abierto (OF). El protocolo de esta prueba se describe en el Ejemplo 1.3.2.

Los resultados en la Figura 4 representan el tiempo pasado en el centro de la OF. Como era de esperar, los animales mayores pasan menos tiempo en el centro del dispositivo que los animales más jóvenes, lo que refleja un comportamiento similar al de la ansiedad. No obstante, los animales mayores que recibieron hidrolizado de H2 no tuvieron un tiempo de exploración significativamente diferente en el centro de la prueba que los animales más jóvenes que recibieron suplementos o no. Por lo tanto, la suplementación con H2 previene el comportamiento similar a la ansiedad en animales mayores y mantiene un nivel similar al de los animales más jóvenes.

Los resultados de esta prueba se combinaron con el ensayo de corticosterona basal (según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.4.1). Se puede ver (Figura 4) que, en la población de blanco, los animales mayores presentaban tasas de corticosterona más importantes que los animales más jóvenes. En la población suplementada con el hidrolizado, se encontró que las tasas de corticosterona eran equivalentes en animales jóvenes y mayores.

Así, en animales mayores, la suplementación con hidrolizados permite un retorno de las tasas de corticosterona a los

niveles basales.

3.2. Efecto del hidrolizado de H2 sobre la reactividad al estrés

Es bien sabido que las personas mayores tienen habilidades de adaptación deterioradas y dificultades para lidiar con las tensiones menores de la vida cotidiana. Se probaron los efectos de la suplementación con hidrolizado sobre la reactividad al estrés.

Para ello, se indujo un estrés moderado en ratones mediante una inmovilización de 30 minutos. El protocolo de esta prueba se describe en el Ejemplo 1.3.6. Luego, se extrajo sangre a los 30, 60 y 90 minutos para determinar la cinética de la expresión de corticosterona en respuesta al estrés (como se describió en el Ejemplo 1.4.1).

Los resultados en la Figura 5 muestran que a los 30 min no hay efecto de la edad ni de la suplementación, pero se encontró una interacción significativa [edad x suplementación]. De hecho, a los 30 minutos, los ratones de blanco envejecidos secretaron menos corticosterona después del estrés que los ratones mayores suplementados con hidrolizado, lo que sugirió una respuesta alterada al estrés. A los 90 min, se encontró una interacción significativa [edad x suplementación]. De hecho, a los 90 minutos, los ratones de blanco mayores secretaban menos corticosterona después del estrés por restricción en comparación con los ratones de blanco jóvenes, lo que sugirió una respuesta alterada al estrés. Así mismo, la suplementación con hidrolizado restaura las tasas de corticosterona en ratones de edad similar a las de los ratones jóvenes y previene esta alteración relacionada con la edad en la respuesta al estrés. Igualmente, se observaron los mismos resultados cuando se suplementó a los animales con una combinación de hidrolizado y DHA (Figura 5).

Así, la suplementación de hidrolizado, con o sin DHA, en animales mayores restaura una reactividad al estrés similar a la de los ratones jóvenes.

Como fase adicional, se cuantificó la expresión de genes implicados en la respuesta al estrés en el hipotálamo (se siguió el protocolo descrito en el Ejemplo 1.4.5). La Figura 6 muestra que la edad no tiene impacto en la expresión de los genes CrhR1, CRHBP y HSD11 β 1. Por el contrario, la suplementación con hidrolizado aumenta significativamente la expresión de CrhR1 y CRHBP y tiende a aumentar la expresión de HSD11 β 1, lo que sugiere que los ratones suplementados con hidrolizado tienen una modulación más importante de la expresión génica de respuesta al estrés.

3.3. Efecto del hidrolizado de H2 en la memoria del hipocampo

La memoria de trabajo y la memoria episódica, memorias autobiográficas que implican una noción espacial, son las formas de memoria más afectadas durante el proceso de envejecimiento.

En los animales, la memoria episódica no puede evaluarse como tal. Por lo tanto, se modela mediante el estudio de la memoria espacial.

3.3.1. Efecto del hidrolizado de H2 en la memoria a corto plazo del hipocampo

La prueba del laberinto en Y (descrita en el Ejemplo 1.3.1) evalúa la memoria de trabajo espacial a corto plazo e implica la trayectoria prefrontal del hipocampo.

Los resultados que se muestran en la Figura 7 representan el índice de reconocimiento del nuevo brazo.

Los resultados muestran que los ratones jóvenes reconocían el nuevo brazo independientemente de la suplementación, ya que exploraban preferiblemente este brazo de una manera significativamente diferente a por azar (33 %). Los animales de blanco mayores presentaban una capacidad de memoria deteriorada ya que no exploraban el brazo nuevo de una manera diferente a la exploración al azar. La suplementación con hidrolizado de H2 mantiene significativamente la capacidad de memoria de los animales mayores (Figura 7).

Se observaron los mismos resultados cuando los animales se suplementaron con hidrolizado suplementado con DHA (Figura 7).

Así, la suplementación con hidrolizado, con o sin DHA, en animales mayores previene los déficits de memoria dependientes del hipocampo.

3.3.2. Efecto del hidrolizado de H2 en la memoria a largo plazo del hipocampo

En la prueba del laberinto acuático de Morris (descrita en el Ejemplo 1.3.3) se evalúa tanto el aprendizaje como la memoria.

En cuanto al aprendizaje espacial, todos los ratones, jóvenes o mayores, suplementados o no suplementados, aprendieron la localización de la plataforma ya que la distancia recorrida para llegar a la plataforma disminuyó a lo largo de los días de aprendizaje. No obstante, los ratones mayores recorrieron más distancia para llegar a la plataforma, lo que indica un déficit de aprendizaje espacial (Figura 8).

La prueba de la sonda (descrita en el Ejemplo 1.3.4) prueba la memoria de referencia espacial de los animales. Se realizó 72 horas después del último día de aprendizaje.

En esta prueba se distinguen cuatro cuadrantes, el cuadrante opuesto (este) corresponde al punto de introducción de los ratones a la piscina, los cuadrantes adyacentes (norte y sur), y el cuadrante diana (oeste) que corresponde a la localización anterior de la plataforma ahora ausente.

Los resultados muestran que los ratones jóvenes recorren más distancia en el cuadrante diana que en los otros cuadrantes. Por lo tanto, estos ratones recuerdan la localización de la plataforma. Por el contrario, los ratones mayores con una discapacidad de aprendizaje espacial recorrieron la misma distancia en los cuatro cuadrantes. Por lo tanto, se puede concluir que estos ratones no recuerdan la localización de la plataforma. En ratones mayores suplementados con hidrolizado, no se recuperó el deterioro en la capacidad de memoria (Figura 8).

Así, no observamos ninguna diferencia en el aprendizaje entre animales jóvenes y mayores, pero los animales mayores presentan alteraciones cognitivas independientemente de la dieta. No obstante, un análisis más detallado de las estrategias de aprendizaje (descrito en el Ejemplo 1.3.5) muestra efectos positivos del hidrolizado.

Para llegar a la plataforma en la piscina, los ratones usan señales espaciales en las paredes de la habitación. Durante el proceso de aprendizaje, los ratones pasan de estrategias no espaciales a estrategias espaciales más elaboradas. Por lo tanto, se investigaron las diferencias entre los grupos en la utilización de estrategias espaciales en el día a día.

Se encontró que los ratones de blanco progresaron a una estrategia espacial a medida que progresaban los días de aprendizaje, antes de alcanzar una meseta en los jóvenes. Para los grupos suplementados, se encontró una mayor utilización de estrategias espaciales desde el día 1, lo que indicaba un efecto beneficioso del hidrolizado (resultados no mostrados).

También se comparó día a día la utilización de estrategias espaciales entre los grupos (Figura 9).

El día 1: Los ratones suplementados con hidrolizado utilizan más estrategias espaciales.

El día 2: Los efectos de la suplementación con hidrolizado ya no se observan, no obstante, los ratones mayores utilizan menos estrategias espaciales que los ratones más jóvenes.

Los días 3 y 4: Las diferencias entre los grupos ya no se observan, lo que demuestra que los ratones mayores utilizan tantas estrategias espaciales como los ratones más jóvenes.

Así, la suplementación con hidrolizado aumenta la utilización de estrategias espaciales en el día 1.

En conclusión, todas estas pruebas *in vivo* muestran que la suplementación con hidrolizado tiene efectos beneficiosos sobre la reactividad al estrés por un lado y sobre la memoria a corto plazo dependiente del hipocampo por el otro.

Ejemplo 4: Análisis bioquímicos de los efectos del hidrolizado de H2 en la neuroinflamación del hipocampo

En condiciones fisiológicas, la microglía, que son las células inmunocompetentes del cerebro, mantiene la homeostasis al vigilar el medio ambiente. Estas células expresan CD11b. En presencia de estrés o agresión, el patógeno (en este caso LPS) se une a su receptor (TLR4) expresado por las células microgliales, lo que conduce a la activación de la microglía que después expresa Iba1. La activación de la microglía conduce a la activación de la vía NFκB y, por lo tanto, a la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1β y TNF-α. La liberación de estas citocinas proinflamatorias interrumpe la comunicación neuronal, lo que puede dañar las neuronas circundantes. Después, las neuronas secretan factores de crecimiento neuronal (NGF, BDNF) que inhiben el NFκB y, por lo tanto, la inflamación, lo que contribuye al retorno a la homeostasis.

Con el envejecimiento, se establece una inflamación crónica de bajo nivel. Se caracteriza por un aumento en el número de microglia y reactividad microglial y, en consecuencia, una liberación más importante de citocinas proinflamatorias en el estado basal.

Así, se estudió la expresión de los marcadores microgliales Cd11b e Iba1 durante el envejecimiento (según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.4.5).

Los resultados muestran que los ratones mayores expresan de manera más importante Cd11b e Iba1, marcadores de inflamación crónica de bajo grado. Curiosamente, la suplementación con hidrolizados disminuye significativamente su expresión, lo que disminuye la activación microglial, lo que es beneficioso para los animales mayores (Figura 10).

En conclusión, la suplementación con hidrolizado tiene efectos beneficiosos sobre la neuroinflamación del hipocampo.

Ejemplo 5: Efecto *in vivo* del hidrolizado de H2 en el metabolismo energético del hipocampo durante el envejecimiento (inflamación crónica)

Las mitocondrias y los peroxisomas son orgánulos que desempeñan un papel importante en el metabolismo energético

celular. Se distribuyen a nivel de los diferentes tipos celulares (neuronas, microglía, etc.). Las mitocondrias se consideran la «central energética» y generan ATP implicado en el mantenimiento y la reparación celular y necesario para determinadas funciones tales como la neurotransmisión en el caso de las neuronas. Por un mecanismo similar al de la mitocondria, los peroxisomas (orgánulos celulares que participan principalmente en la desintoxicación celular) también realizan la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga. Los resultados (según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.4.6) muestran que las enzimas implicadas en la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal se ven afectadas por la suplementación con hidrolizado (Figura 11). De hecho, la expresión de acil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y 3-cetoacil-CoA tiorasa (implicadas en la 1ª, 2ª, 3ª y últimas etapas de la β -oxidación mitocondrial, respectivamente) aumenta con la suplementación. Se encontró una interacción entre la edad y la suplementación para la expresión de acil-CoA oxidasa (implicada en la 1ª etapa de la β -oxidación peroxisomal). Inesperadamente, el hidrolizado de H2 amplificó la expresión de genes de enzimas implicadas en el metabolismo celular.

Ejemplo 6: Efecto *in vivo* del hidrolizado de H2 sobre las defensas antioxidantes del hipocampo durante el envejecimiento (inflamación crónica)

Durante el envejecimiento, las células tienden a acumular moléculas agregadas disfuncionales resultantes del desequilibrio oxidativo: se observa un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno y/o una disminución de las defensas antioxidantes. Se evaluó el efecto del hidrolizado sobre la glutatión S-transferasa, que es una enzima de defensa antioxidante, y sobre la gliceronafofato O-aciltransferasa, que interviene en la primera etapa de la síntesis de plasmalógenos, lípidos con función antioxidante. Los resultados (obtenidos según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.4.6) muestran que la suplementación con hidrolizado aumenta la expresión de genes para estas enzimas, lo que sugiere un efecto positivo del hidrolizado sobre las defensas antioxidantes (Figura 12).

Ejemplo 7: Efecto *in vivo* del hidrolizado de H2 en la neuroinflamación del hipocampo en respuesta a la inflamación aguda

Se evaluó el efecto del hidrolizado sobre la inflamación aguda (inducida por LPS) en ratones suplementados durante 18 días con hidrolizado o DHA (según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.4.5).

A continuación, se evaluaron los cambios en la expresión de citocinas proinflamatorias en respuesta a LPS (Figura 13). Como era de esperar, LPS aumentó significativamente la expresión de IL-6, TNF- α , IL-1 β . La suplementación moduló significativamente la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α e IL-1 β). Se encontró una interacción LPS x suplementación para IL-6 y TNF- α y una tendencia para IL-1 β . De hecho, en los animales tratados con LPS, la expresión de IL-6 disminuyó significativamente con la suplementación con hidrolizado y DHA, mientras que la expresión de TNF- α disminuyó con la suplementación con hidrolizado.

También se determinó la expresión de COX-2 (según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.4.5), implicada en la síntesis de los mediadores lipídicos de la inflamación. Su expresión aumentó significativamente con el tratamiento con LPS y disminuyó significativamente con la suplementación (Figura 14).

Se evaluó la expresión de la proteína I κ B (según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.4.7) implicada en la regulación de la expresión de estos factores inflamatorios (Figura 15). Los suplementos tienen un efecto significativo sobre la expresión de I κ B (que es un inhibidor de NF κ B, responsable de la síntesis de factores inflamatorios) y se ha demostrado una interacción entre los suplementos y LPS. De hecho, en condiciones inflamatorias, la expresión de I κ B aumenta significativamente con la suplementación con hidrolizado.

Los PUFA se pueden convertir en derivados de lípidos bioactivos u oxilipinas, que contribuyen a sus propiedades inmunomoduladoras. Los derivados de los PUFA n-6 son en su mayoría proinflamatorios, mientras que los derivados de los PUFA n-3 son antiinflamatorios. El impacto de la suplementación en la composición de ácidos grasos (según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.4.8) y en la concentración de oxilipinas derivadas de PUFA n-6 y n-3 en el hipocampo (según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.4.9)) después de que se evaluó el tratamiento con NaCl o LPS.

En primer lugar, se ha demostrado que la suplementación tiene un impacto en la composición de PUFA en la corteza: la suplementación aumenta las tasas de PUFA n-3 y disminuye los niveles de PUFA n-6. Casi todos los PUFA se ven afectados: 20:3 n-6, 20:4 n-6, 22:4 n-6, 22:5 n-6, 20:5 n-3 and 22:6 n-3. La suplementación modula las concentraciones de derivados del ácido araquidónico y DHA (Figura 16). Así mismo, se encontró una interacción entre los factores LPS y la suplementación para las oxilipinas derivadas del ácido araquidónico y DHA. De hecho, para los derivados de PUFA n-6, en condiciones salinas, la suplementación con hidrolizado aumentó la concentración de α -PGF2 en comparación con el grupo de blanco. En animales tratados con LPS, la suplementación con hidrolizado aumentó la concentración de PGE2 ($p < 0.01$), PGD2 ($p < 0.01$), PGA1 ($p < 0.001$), 15-HETE ($p < 0.001$), 8-HETE ($p < 0.001$), 12-HETE ($p < 0.001$), 5-oxoETE ($p < 0.001$) en comparación con animales tratados con solución salina. También aumentó las tasas de PGA1, LxA4, 15-HETE, 8-HETE, 5-oxoETE en comparación con los blancos (LxA4 y 8-HETE: $p < 0.05$, 5-oxoETE: $p < 0.01$) o animales suplementados con DHA (LxA4 y 8-HETE: $p < 0.05$, 15-HETE: $p < 0.01$, PGA1: $p < 0.001$). Con respecto a los derivados de DHA, en condiciones inflamatorias, la suplementación con hidrolizado aumentó los niveles de 14-HDoHE ($p < 0.001$), 17-HDoHE ($p < 0.001$) y 7-MaR1 ($p < 0.01$) en comparación con los animales tratados con NaCl y los animales de blanco (14-HDoHE: $p < 0.05$) o suplementación con DHA (17-HDoHE:

$p < 0.05$, 7-MaR1: $p < 0.001$).

Ejemplo 8: Efecto *in vivo* del hidrolizado de H2 sobre la supervivencia neuronal en respuesta a la inflamación aguda

Se evaluó el efecto de la suplementación con hidrolizado de H2 y DHA sobre la expresión de las neurotrofinas BDNF y NGF, según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.4.5 (Figura 17). La suplementación disminuyó la expresión de NGF y BDNF en condiciones basales. En respuesta a LPS, la expresión de BDNF es estable en los grupos suplementados con hidrolizado y DHA, mientras que disminuye en el grupo de blanco.

Referencias

1. European Commission. 2009 Ageing Report: Economic and Budgetary Projections for the EU-27 Member States (2008-2060). Bruselas: European Communities, 2009.
- 10 2. Kinsella K y He.W. An aging world, International population reports 2008. National Institute On Aging, U.S. Census Bureau, p1-191.
3. VAB Nutrition. Focus thématique: les Problématiques Santé actuelles et en émergence qui touchent ou toucheront la cible «Seniors» et l'offre nutritionnelle à développer pour en retarder ou limiter l'impact. 2009. Estudio bibliográfico financiado por Valorial / CRITT Santé Bretagne.
- 15 4. Bousquet J, et al., Operational Definition of Active and Healthy Ageing (AHA): A Conceptual Framework. J Nutr Health Aging. 2015.19(9):955-60.
5. Banfield Pet Hospital's State of Pet Health 2013 Report, disponible en www.banfield.com/Banfield/media/PDF/Downloads/soph/Banfield-State-of-Pet-Health-Report_2013.pdf
- 20 6. Landsberg GM, Nichol J, Araujo JA. Cognitive dysfunction syndrome: a disease of canine and feline brain aging. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2012. 42(4):749-68.
7. Salvin H.E., McGreevy P.D., Sachdev P.S., Valenzuela M.J. Under diagnosis of canine dysfunction: a cross sectional survey in older companion dogs. The Veterinary Journal. 2010. 184: 277-281.
- 25 8. De Smedt-Peyrusse V., Sargueil F., Moranis A., Harizi H., Mongrand S., Layé S. Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization. J Neurochem 2008. 105:296-307.
9. Rey C., Delpech J.C., Madore C., Nadjar A., Greenhalgh AD., Amadiou C., Aubert A., Pallet V., Vaysse C., Layé S., Joffre C. Dietary n-3 long chain PUFA supplementation promotes a pro-resolving oxylipin profile in the brain. Brain Behav Immun 2019. 76:17-27.
- 30 10. Mingam R, Moranis A., Bluthé RM., De Smedt-Peyrusse V., Kelley KW., Guesnet P., Lavialle M., Dantzer R., Layé S. Uncoupling of interleukin-6 from its signalling pathway by dietary n-3-polyunsaturated fatty acid deprivation alters sickness behaviour in mice. Eur J Neurosci 2008 28:1877-86.
11. Labrousse VF, Nadjar A, Joffre C, Costes L, Aubert A, Gregoire S, Bretillon L, Layé S. Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. PLoS One 2012. 7:e36861.
- 35 12. MoranisA., Delpech JC., De Smedt-Peyrusse V., Aubert A., Guesnet P., Lavialle M., Joffre C., Layé S. Long term adequate n-3 polyunsaturated fatty acid diet protects from depressive-like behavior but not from working memory disruption and brain cytokine expression in aged mice. Brain Behav Immun 2012. 26:721-31.
13. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. Journal of Neuroscience Methods 1984. 11:47-60.
- 40 14. Bensalem J., Dudonné S., Gaudout D., Servat L., Calon F., Desjardins Y., Layé S., Lafenêtre P., Pallet V. Polyphenol-rich extract from grape and blueberry attenuates cognitive decline and improves neuronal function in aged mice. J Nutr Sci 2018. 7:e19.
15. Brody D.L., Holtzman D.M. Morris water maze search strategy analysis in PDAPP mice before and after experimental traumatic brain injury. Exp Neurol 2006. 197:330-340.
- 45 16. Garthe A., Behr J., Kempermann G. Adult-Generated Hippocampal Neurons Allow the Flexible Use of Spatially Precise Learning Strategies. PLOS ONE 2009. 4: e5464.
17. Ruediger S., Spirig D., Donato F., Caroni P. Goal-oriented searching mediated by ventral hippocampus early in trial-and-error learning. Nature Neuroscience 2012. 15:1563-1571.
18. Rey C., Nadjar A., Buaud B., Vaysse C., Aubert A., Pallet V., Layé S., Joffre C. Resolvin D1 and E1 promote

resolution of inflammation in microglial cells in vitro. *Brain Behav. Immun.* 2016. 55:249-259.

19. Folch J., Lees M., Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957. 226: 497-509.

5 20. Le Faouder P., Baillif V., Spreadbury I., Motta J.P., Rousset P., Chene G., Guigne C., Terce F., Vanner S., Vergnolle N., Bertrand-Michel J., Dubourdeau M., Cenac N. LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2013. 932:123-133.

21. Adler-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.* 1976 24:1090-1093.

10 22. Nielsen, P. M.; Petersen, D.; Dammann, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science* 2001, 66, 642-646.

23. Mathieu-Resuge, et al., Trophic ecology of suspension-feeding bivalves inhabiting a north-eastern Pacific coastal lagoon: Comparison of different biomarkers. *Marine environmental research*, 145, 155-16 (2019).

24. F. Guérard et al., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19-20 (2002) 489-498.

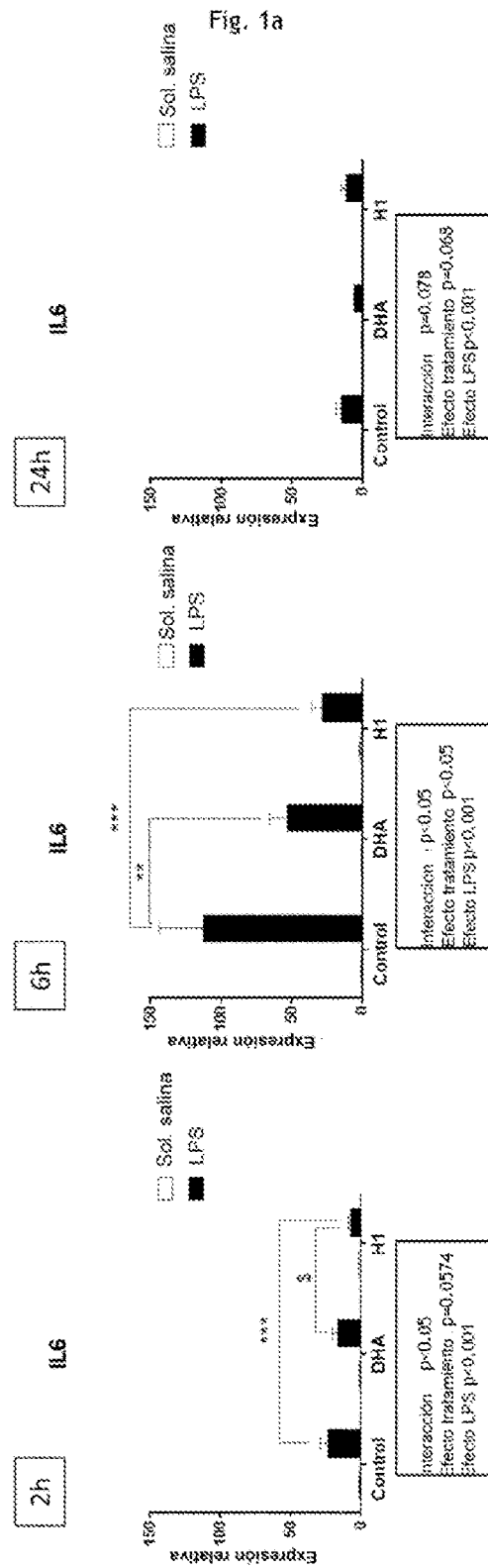
REIVINDICACIONES

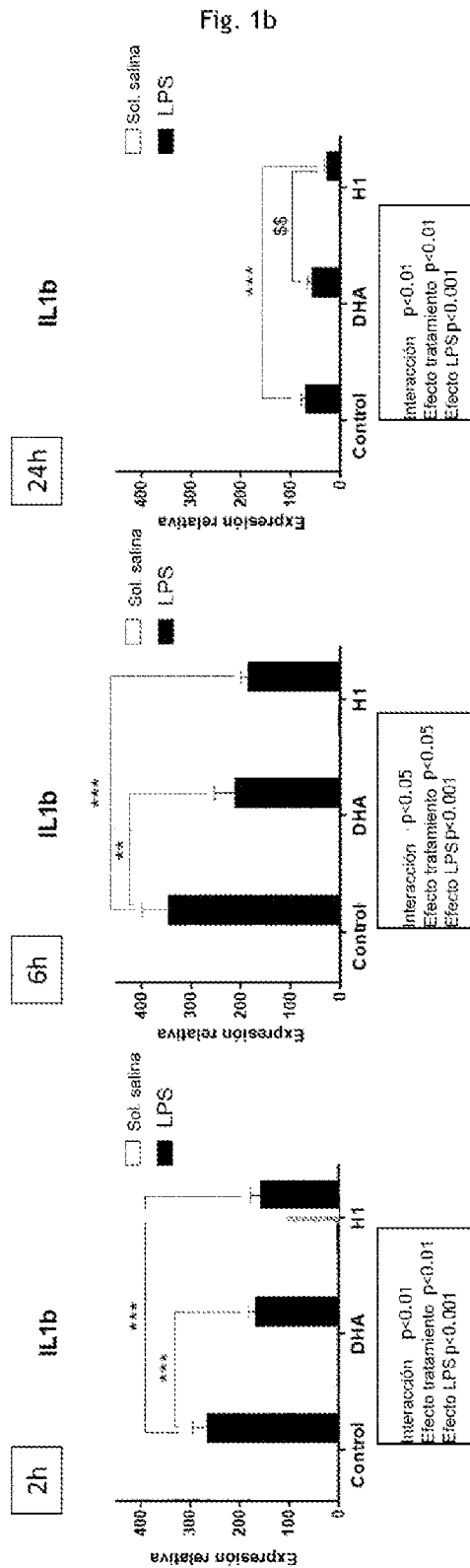
1. Hidrolizado de proteínas obtenido a partir de al menos una fuente de proteínas de pescado azul que comprende:
 - (I) un grado de hidrólisis (GH) de al menos un 10 %,
 - (II) al menos un 80 % de proteínas solubles en agua con un peso molecular menor que 1000 Da,
 - 5 (III) al menos un 0.3 % de fosfolípidos, y
 - (IV) al menos un 0.5 % de DHA y EPA.
2. Un hidrolizado de proteínas según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha fuente de proteínas se deriva al menos de cabezas de pescado azul.
3. Hidrolizado de proteínas según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado por que dicho hidrolizado de proteínas está complementado con ácido docosahexaenoico (DHA).
- 10 4. Hidrolizado de proteínas según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado por que se obtiene mediante un proceso de hidrólisis enzimática que comprende las etapas siguientes:
 - a. proporcionar una fuente de proteínas;
 - b. moler dicha fuente de proteínas;
 - 15 c. opcionalmente, ajustar el pH;
 - d. añadir al menos una enzima hidrolizante;
 - e. calentar;
 - f. separar;
 - g. secar.
- 20 5. Composición alimenticia que comprende al menos un hidrolizado de proteínas tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que es un alimento completo o un complemento alimenticio.
6. Composición alimenticia según la reivindicación 5, caracterizada por que dicha composición alimenticia es un alimento funcional o nutracéutico.
- 25 7. Composición alimenticia según la reivindicación 5 o 6, caracterizada por que dicha composición alimenticia es un complemento alimenticio, especialmente un alimento funcional o nutracéutico para el ser humano.
8. Composición alimenticia según la reivindicación 6, caracterizada por que dicha composición alimenticia es un alimento para mascotas, preferiblemente un alimento para perros o gatos.
9. Proceso para preparar un hidrolizado de proteínas tal como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende las etapas siguientes:
 - 30 a. proporcionar una fuente de proteínas;
 - b. moler dicha fuente de proteínas;
 - c. opcionalmente, ajustar el pH;
 - d. añadir al menos una enzima de hidrólisis;
 - e. calentar;
 - 35 f. separar;
 - g. secar.
10. Proceso para la preparación de un hidrolizado de proteínas según la reivindicación 9, caracterizado por que además comprende una etapa de suplementación con DHA.
11. Kit que comprende, en un solo empaque, diversos contenedores:
 - 40 a) al menos un hidrolizado de proteínas tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4;
 - b) uno o más ingredientes alimenticios para mascotas, preferiblemente elegidos del grupo que consiste en

proteínas, péptidos, aminoácidos, cereales, glúcidos, materias grasas o lípidos, nutrientes, potenciadores de la palatabilidad, digestatos animales, harina de carne, gluten, conservantes, tensioactivos, agentes texturizantes, o estabilizantes, colorantes, compuestos de fosfatos inorgánicos, saborizantes y/o condimentos;

c) opcionalmente al menos DHA.

- 5 12. Composición farmacéutica que comprende al menos un hidrolizado de proteínas tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un portador y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. Hidrolizado de proteínas tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4 o una composición farmacéutica según se reivindica en la reivindicación 12, para su utilización como medicamento.





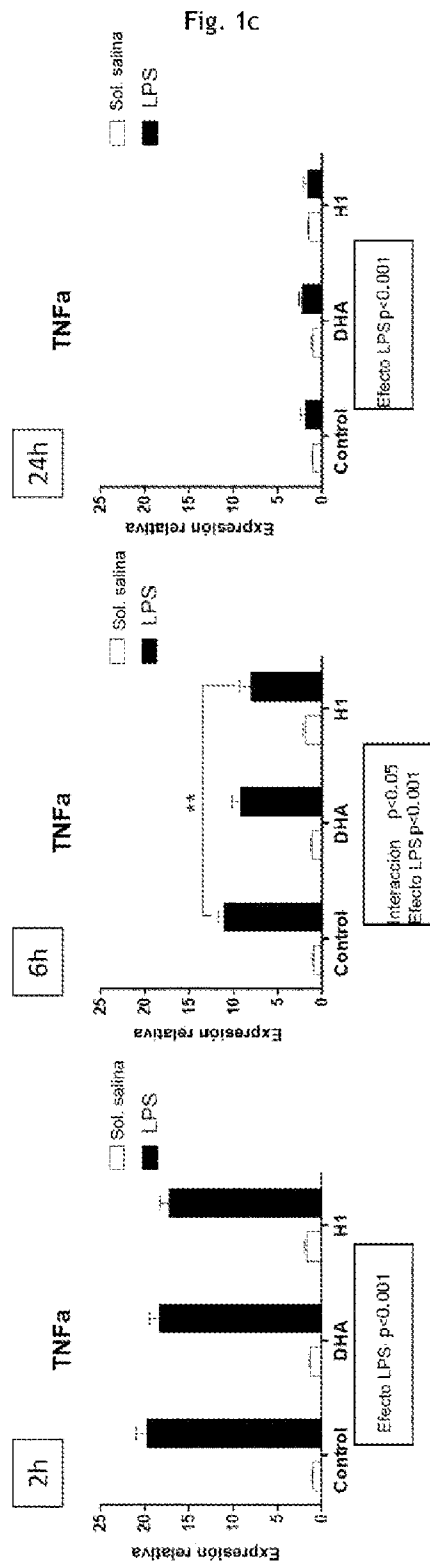


Fig. 2

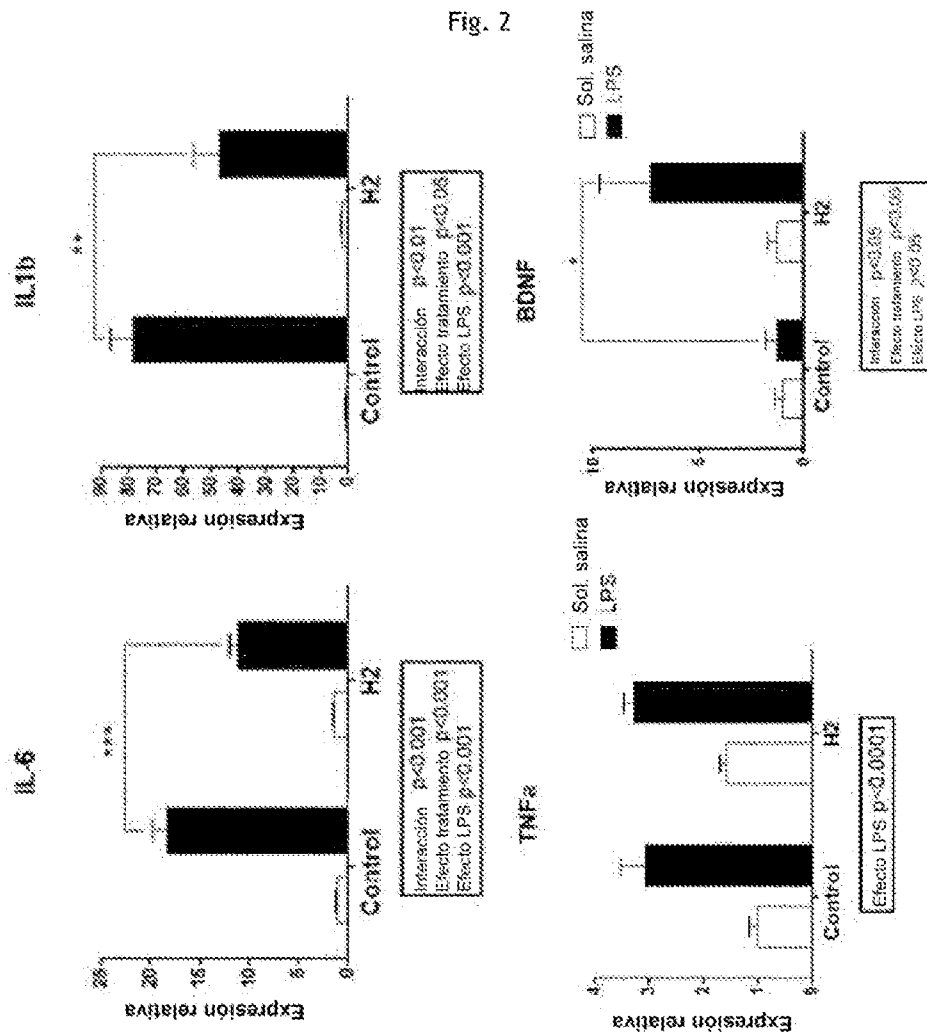


Fig. 3

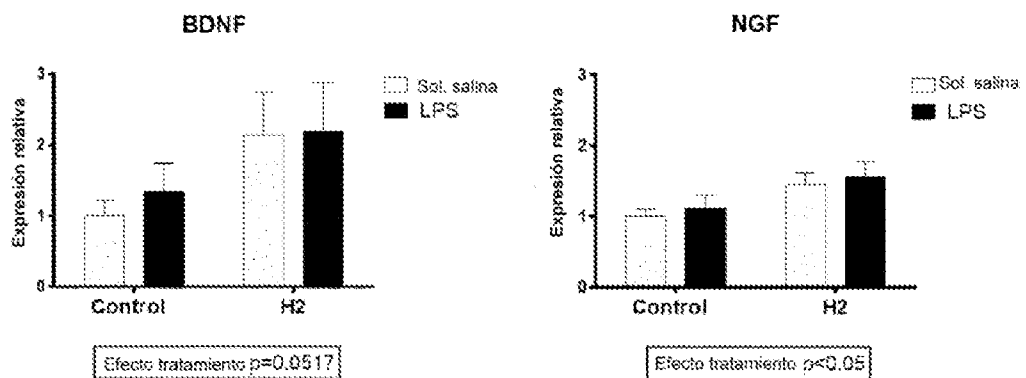
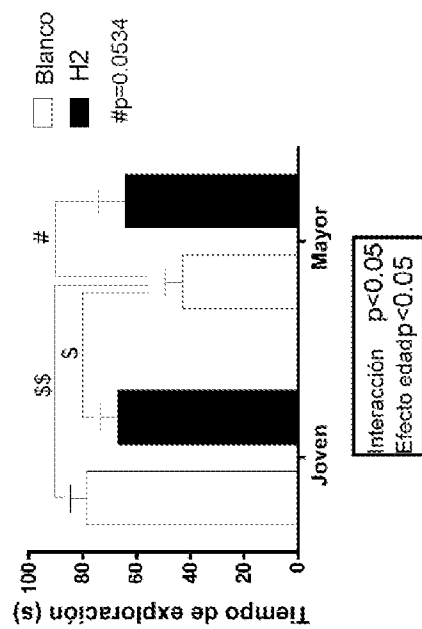
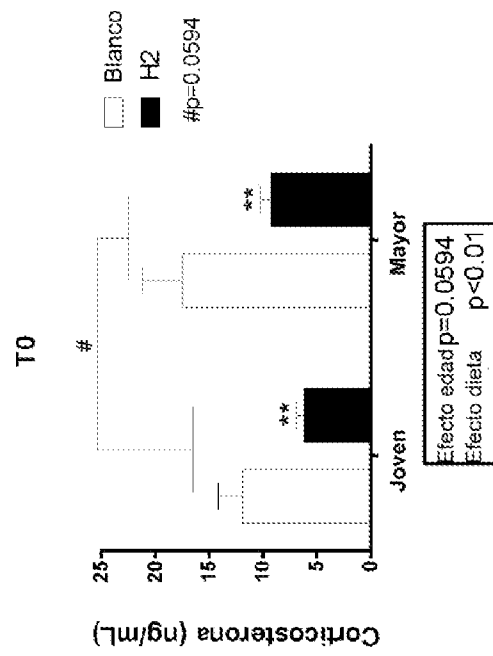


Fig. 4



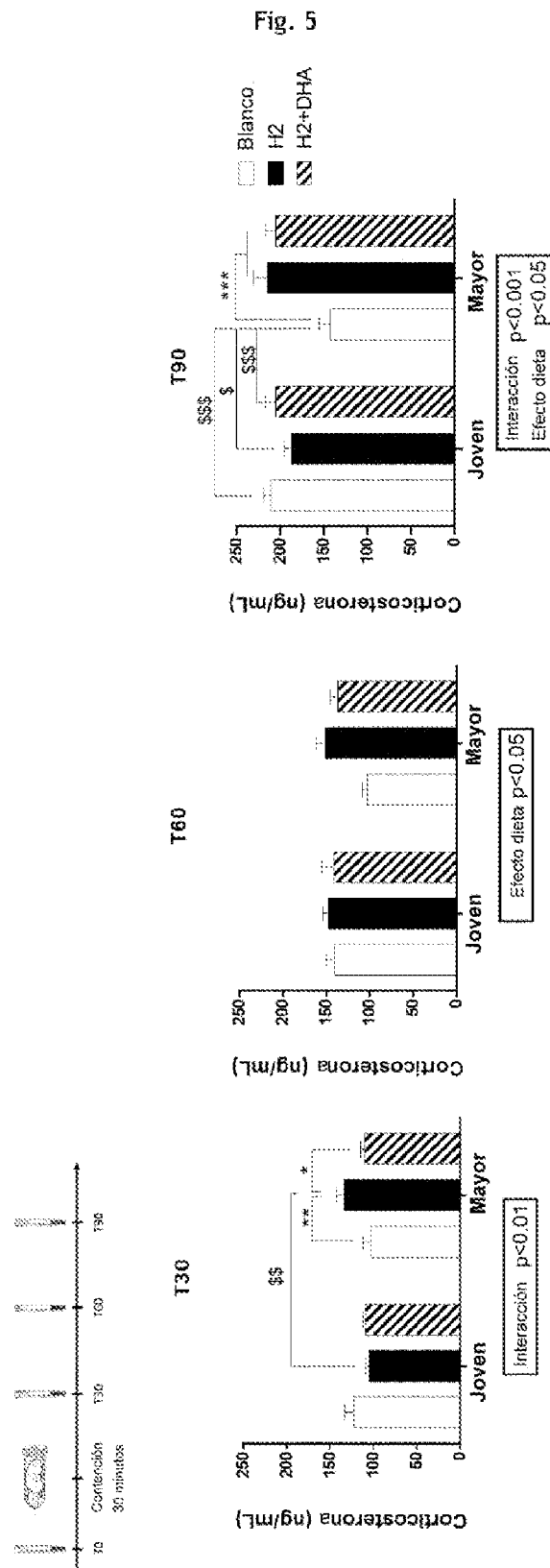
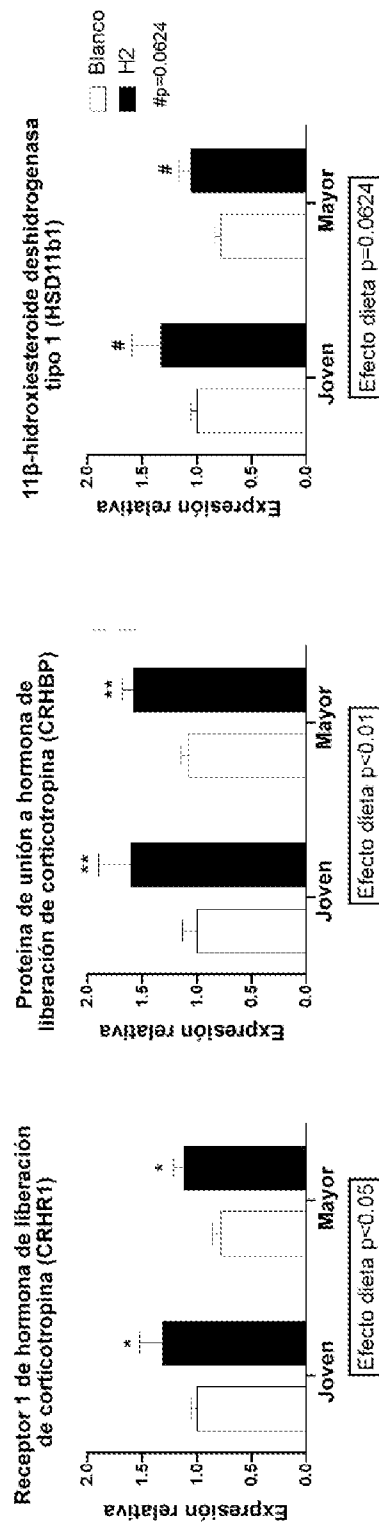
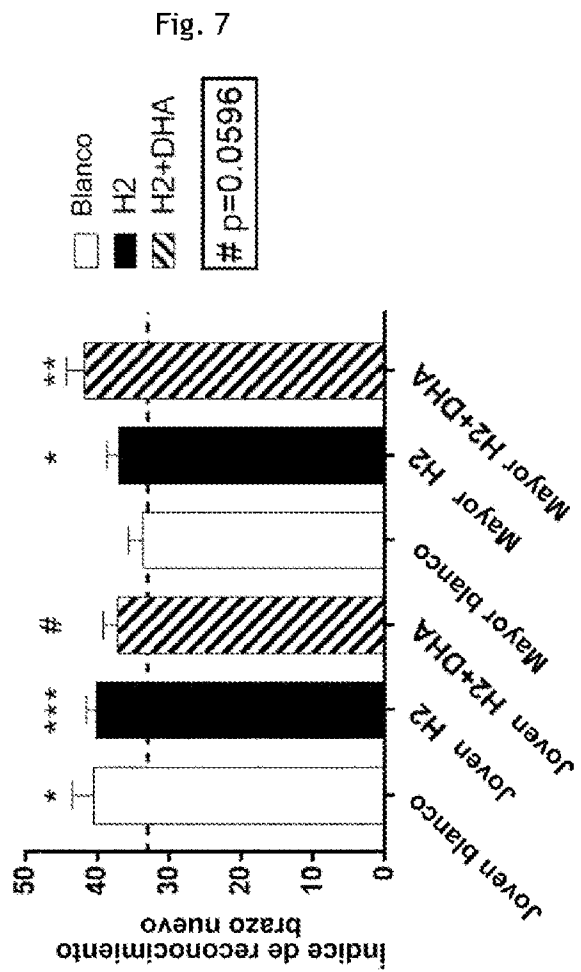
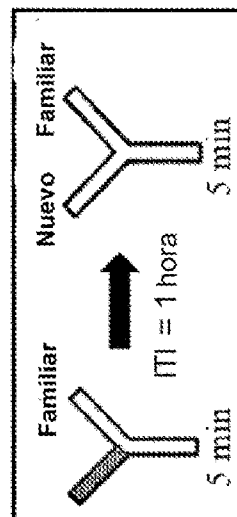
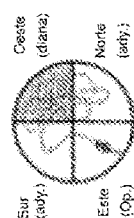


Fig. 6

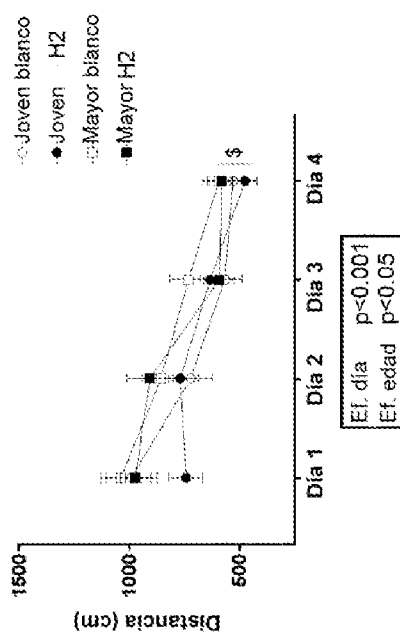






A.

Aprendizaje espacial



B.

«Prueba de sonda»

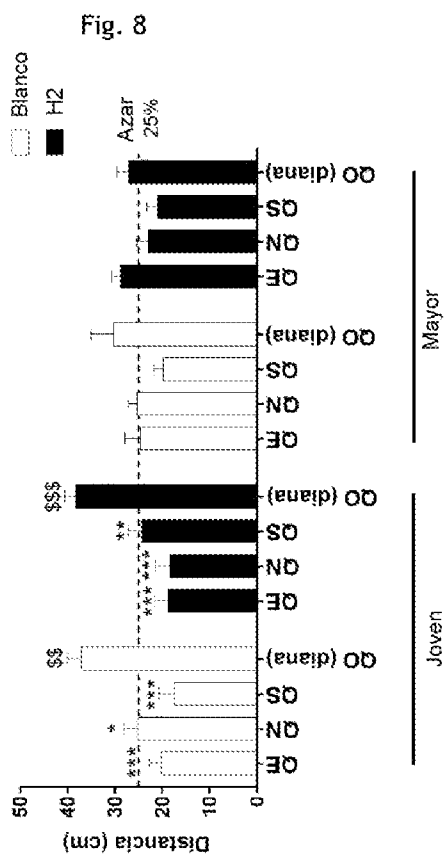


Fig. 8

Fig. 9

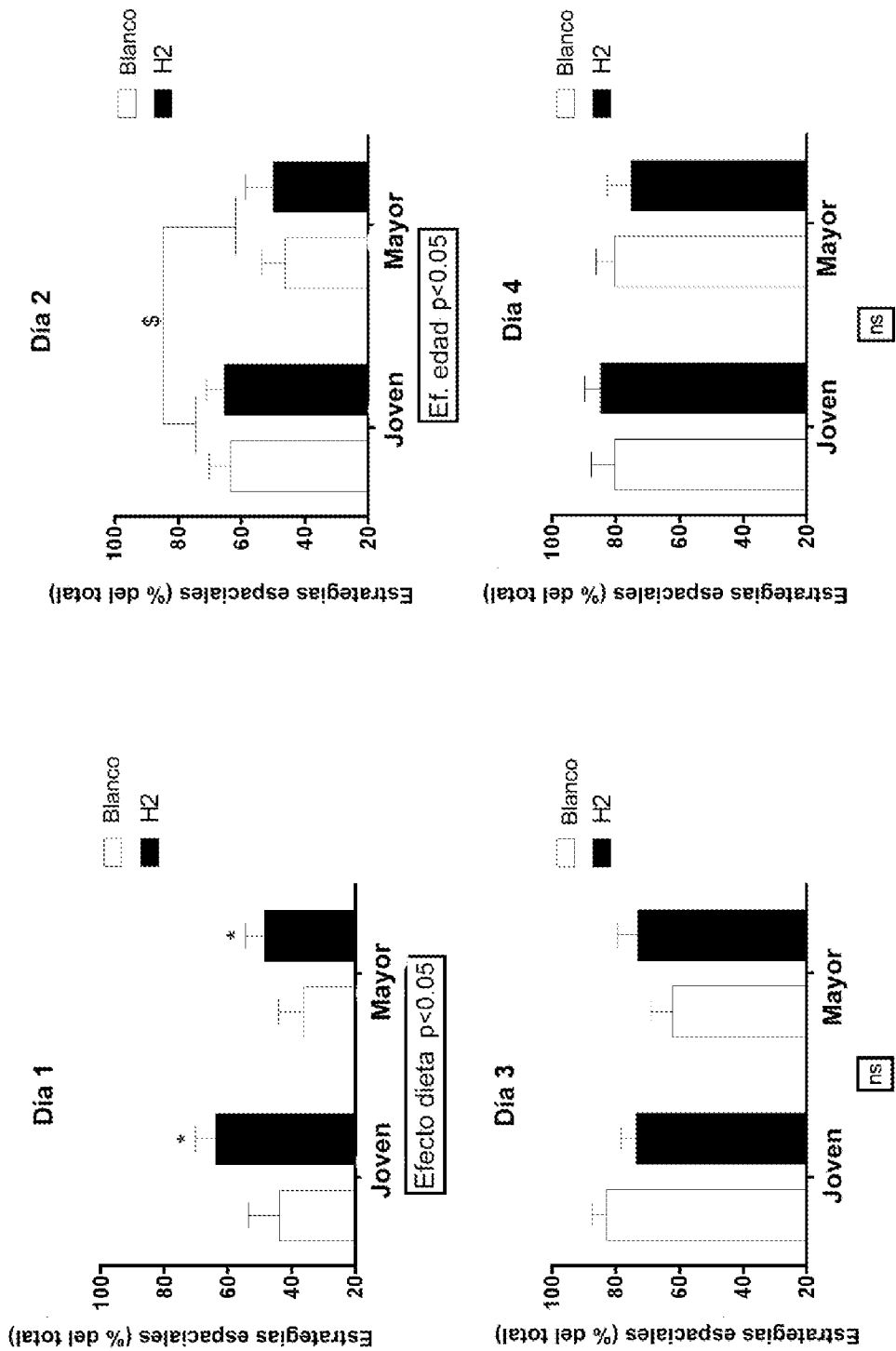


Fig. 10



Fig. 11

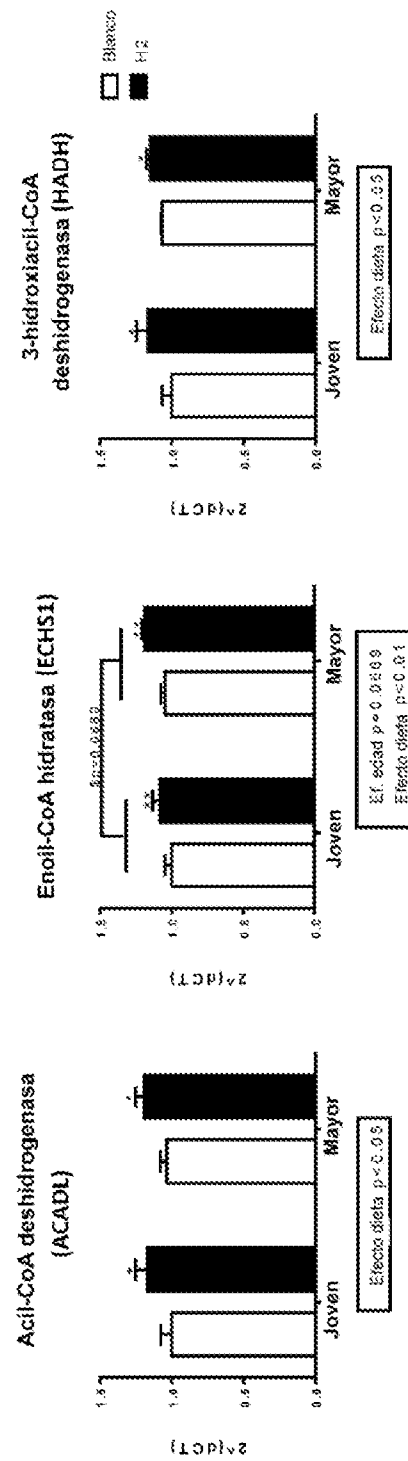


Fig. 11 (continúa)

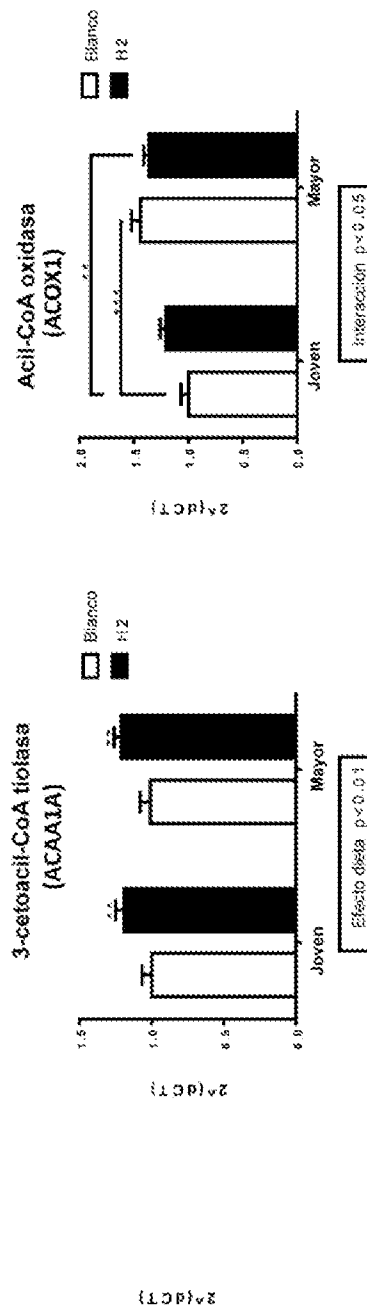


Fig. 12

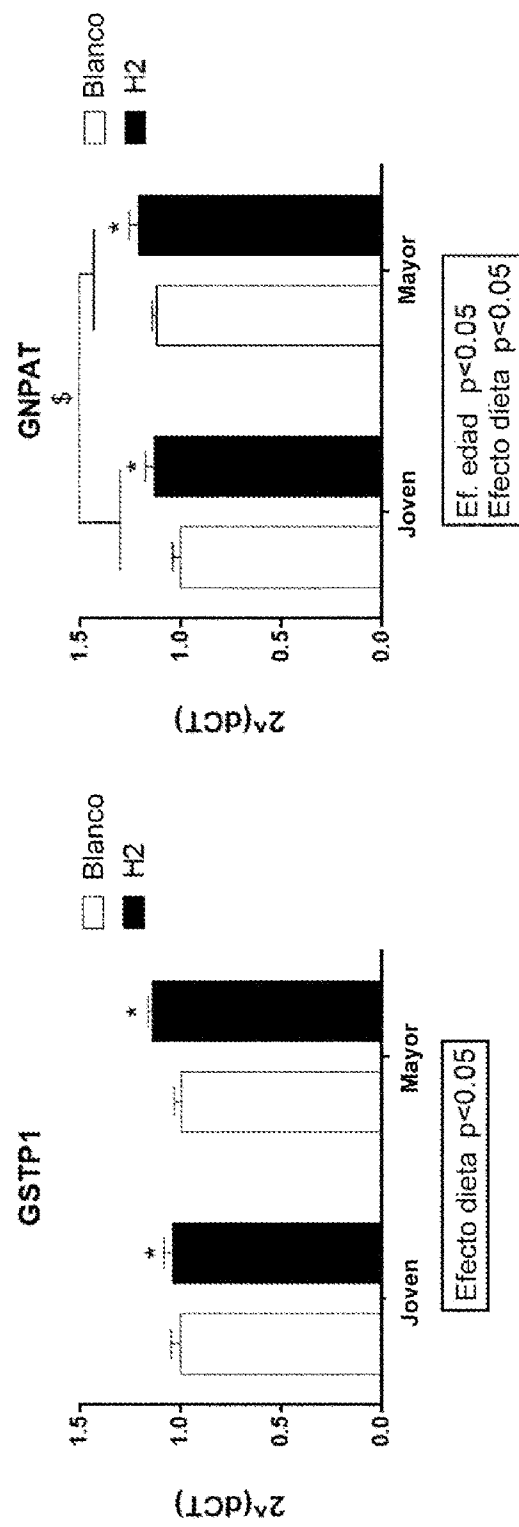


Fig. 13

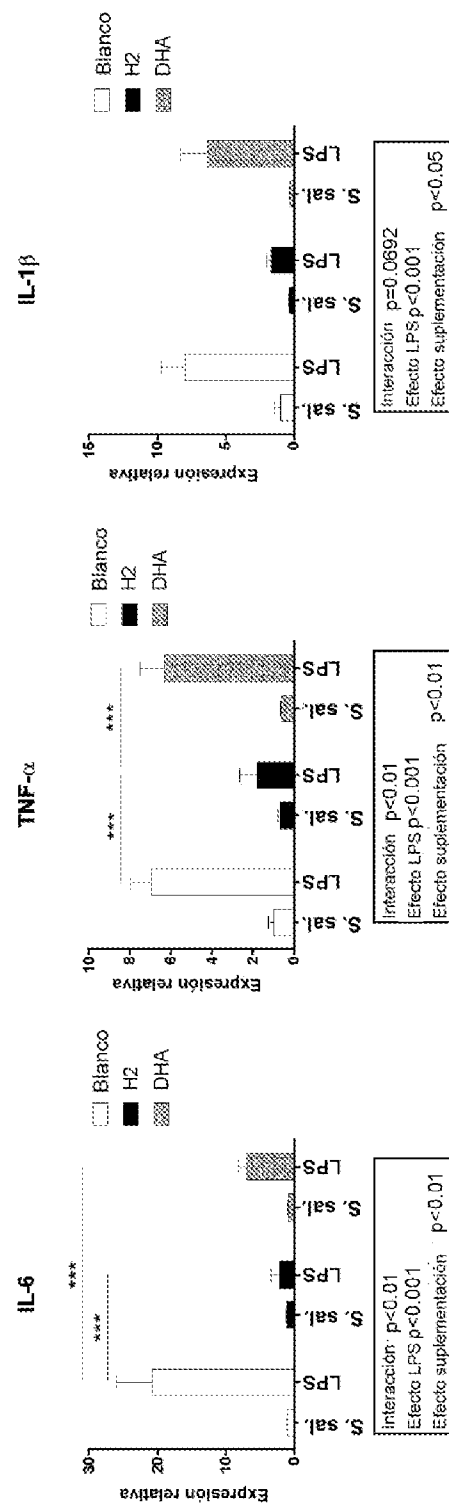


Fig. 14

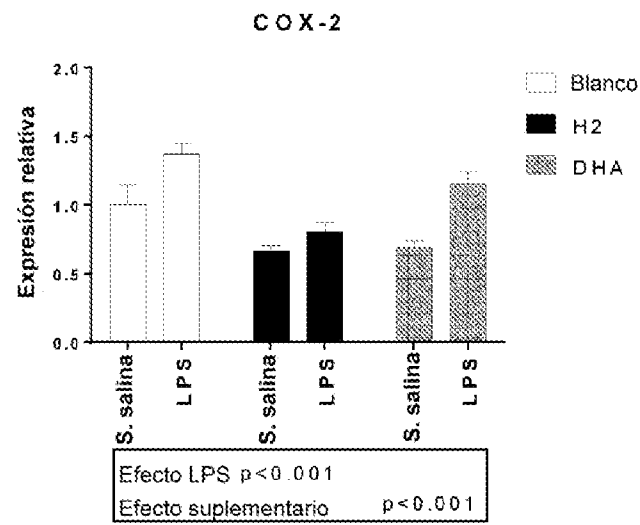


Fig. 15

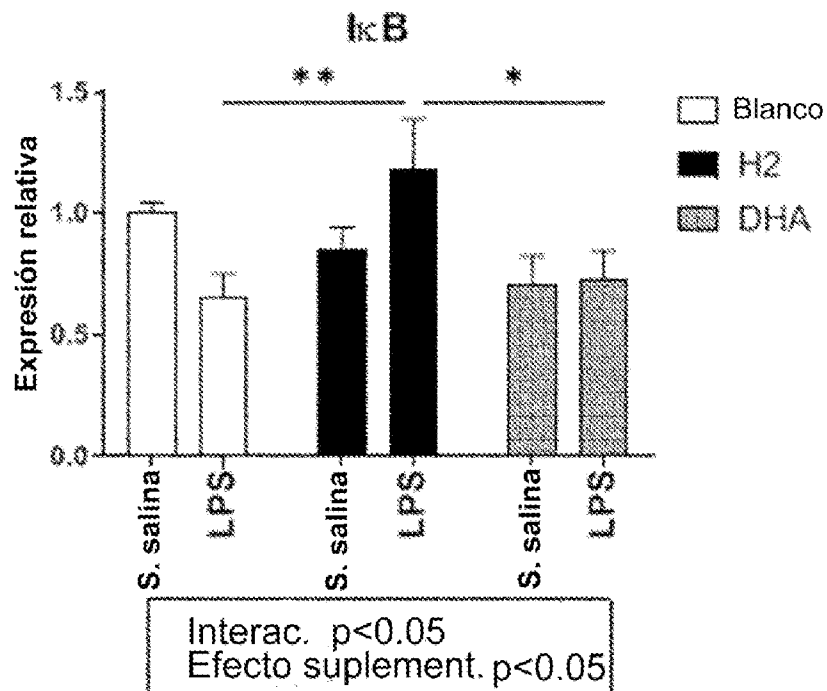


Fig. 16

Oxilipina	Blanco		H2	
	S. salina	LPS	S. salina	LPS
AA-oxilipinas				
Tromboxanos, prostaglandinas				
TXB2	1584.36 ± 136.93	1739.60 ± 138.94	1729.72 ± 220.19	1495.16 ± 30.78
6k-PGF1 α	151.68 ± 68.79 ^a	505.96 ± 66.67 ^{ab}	246.65 ± 83.26	78.59 ± 49.2 ^{ab}
PGF2 α	4129.79 ± 380.97 ^{ab}	5550.45 ± 330.52 ^a	4582.04 ± 486.14 ^b	5708.87 ± 577.25
PGE2	1428.02 ± 141.17 ^a	2366.56 ± 121.53 ^a	1410.87 ± 117.93 ^b	2356.64 ± 224.38 ^b
PGD2	1741.08 ± 319.14 ^a	3208.60 ± 445.99 ^{ac}	1639.05 ± 216.53 ^b	3188.42 ± 282.95 ^b
PGA1	0.00 ± 0.00 ^a	28.65 ± 7.75 ^{ac}	0.00 ± 0.00 ^b	34.75 ± 11.80 ^{bd}
15d-PGJ2	31.15 ± 19.37	71.23 ± 8.44	13.59 ± 13.59	89.69 ± 19.08
8iso-PGA2	464.81 ± 24.87	651.95 ± 76.86	500.41 ± 109.57	864.62 ± 133.33
Lipoxinas				
LXA4	265.31 ± 31.85 ^{ab}	764.10 ± 117.00 ^{ac}	352.61 ± 37.66 ^d	1126.31 ± 115.09 ^{cd}
LXB4	119.60 ± 79.81	413.04 ± 100.91	488.09 ± 79.65	560.64 ± 67.12
Ácidos epoxi-eicosatrienólicos				
14,15-EET	258.15 ± 53.32	218.68 ± 27.43	221.62 ± 44.03	339.82 ± 95.91
8,9-EET	665.74 ± 86.14	717.35 ± 62.99	745.55 ± 88.82	1132.12 ± 251.53
5,6-EET	510.40 ± 59.39	552.36 ± 22.88	607.26 ± 61.65	776.15 ± 152.98
Ácidos hidroxi-eicosatrienólicos				
15-HETE	5381.63 ± 491.85 ^{ab}	10236.55 ± 1132.60 ^a	4986.08 ± 391.85 ^{cd}	12370.92 ± 946.68 ^{de}
8-HETE	616.39 ± 59.62 ^a	861.88 ± 71.18 ^{cd}	536.21 ± 32.63 ^{bc}	1094.93 ± 100.61 ^{bd}
12-HETE	1496.97 ± 53.35 ^a	2662.28 ± 394.98 ^a	1165.01 ± 51.49 ^{bc}	3479.62 ± 252.58 ^{cd}
5-HETE	5518.82 ± 671.54	6747.00 ± 403.13	5464.87 ± 486.33	8902.11 ± 382.00
5-oxo-EET	5521.57 ± 639.67 ^a	6300.15 ± 474.39 ^d	5286.41 ± 199.95 ^{bc}	9143.13 ± 785.06 ^{cd}
LA-oxilipinas				
13-HODE	1294.54 ± 41.33	2091.36 ± 184.04 ^b	1429.20 ± 192.49 ^a	3655.32 ± 871.76 ^{abc}
9-HODE	497.38 ± 19.99 ^{ab}	979.63 ± 109.81 ^{cd}	577.19 ± 76.69 ^c	1628.83 ± 355.30 ^{cd}
DHA-oxilipinas				
17-HDcHE	1208.83 ± 91.11 ^a	2030.94 ± 216.72 ^a	1002.70 ± 83.64 ^{bc}	2428.07 ± 154.48 ^{bd}
14-HDcHE	819.92 ± 71.54 ^a	1171.61 ± 168.81 ^d	639.76 ± 45.18 ^{bc}	1683.52 ± 113.81 ^{bd}
7-MaR1	0.00 ± 0.00 ^b	42.73 ± 11.82 ^{bc}	0.00 ± 0.00 ^b	88.89 ± 50.81 ^{bd}

Fig. 16 (continúa)

Oxílipina	DHA			Efecto estadístico		
	S. salina	LPS	Suplementación	LPS	Suplementación x LPS	
AA-oxilipinas						
Tromboxanos, prostaglandinas						
TXB2	1781.36 ± 166.54	1747.47 ± 205.07	-	-	-	
6-kPGF1 α	210.93 ± 69.00	226.75 ± 92.39 ^c	-	-	p<0.01	
PGF2 α	5656.33 ± 461.46 ^c	5155.75 ± 727.26	p<0.01	p<0.001	p<0.001	
PGE2	1883.66 ± 204.02	1881.02 ± 257.90	-	p<0.001	p<0.05	
PGD2	2391.83 ± 244.21	2178.11 ± 411.06 ^c	-	p<0.01	p<0.05	
PGA1	0.00 ± 0.00	0.60 ± 0.00 ^{c,d}	p<0.01	p<0.001	p<0.01	
15-kPGI2	45.69 ± 23.73	53.66 ± 24.59	-	p<0.05	-	
8-isoPGI2	682.20 ± 116.56	750.64 ± 92.68	-	p<0.05	-	
Lipoxinas						
LXA4	631.05 ± 121.16 ^b	614.25 ± 151.20 ^c	-	p<0.001	p<0.01	
LXB4	342.60 ± 115.89	309.99 ± 112.83	p<0.05	-	-	
Ácidos epoxi-eicosatrienoicos						
14,15-EET	317.46 ± 68.49	321.12 ± 36.59	-	-	-	
8,9-EET	984.20 ± 127.64	904.92 ± 119.39	-	-	-	
5,6-EET	730.88 ± 94.28	687.14 ± 90.15	-	-	-	
Ácidos hidroxi-eicosatrienoicos						
15-HEHE	8412.97 ± 1033.41 ^{b,d}	8271.61 ± 1124.26 ^c	-	p<0.001	p<0.01	
8-HEHE	825.45 ± 81.77 ^c	823.81 ± 84.78 ^c	-	p<0.001	p<0.01	
12-HEHE	2076.89 ± 258.48 ^b	2145.92 ± 439.73 ^d	-	p<0.001	p<0.01	
5-HEHE	7715.60 ± 1005.41	8939.82 ± 1212.00	p<0.05	p<0.05	-	
5-oxoETE	8623.43 ± 291.86 ^{a,b}	7449.52 ± 981.74	p<0.01	p<0.05	p<0.01	
LA-oxilipinas						
13-HODE	2266.32 ± 315.64	2212.73 ± 319.80 ^c	-	p<0.01	p<0.05	
9-HODE	967.76 ± 132.13 ^b	950.76 ± 147.61 ^c	-	p<0.001	p<0.01	
DHA-oxilipinas						
17-HDoHE	1717.12 ± 318.00 ^c	1731.76 ± 194.00 ^b	-	p<0.001	p<0.01	
14-HDoHE	1266.36 ± 167.27 ^{a,c}	1290.29 ± 175.01	-	p<0.001	p<0.01	
7-MaR1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^{c,d}	p<0.01	p<0.001	p<0.01	

Fig. 17

