(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 080 777**

(21) Número de solicitud: 202530235

(51) Int. CI.:

C07K 4/12 (2006.01)
C07K 1/12 (2006.01)
A61K 38/01 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

19.03.2025

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

07.10.2026

(71) Solicitantes:

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI (66,00%)
Carrer de l'Escorxador, s/n
43003 Tarragona (Tarragona) ES y
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (34,00%)

(72) Inventor/es:

IBARZ BLANCH, Néstor;
GARZÓN GARCÍA, Lidia;
GONZÁLEZ PARAMÁS, Ana María;
SANTOS BUELGA, Celestino;
MUGUERZA MARQUÍNEZ, Begoña y
BRAVO VÁZQUEZ, Francisca Isabel

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

(54) Título: **Hidrolizados, péptidos, composiciones que los comprenden, y sus usos**

(57) Resumen:

Hidrolizados, péptidos, composiciones que los comprenden, y sus usos.

La presente invención se refiere a hidrolizados de patas de pollo, sus péptidos y composiciones que los comprenden, y a su uso en terapia, en particular en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas.

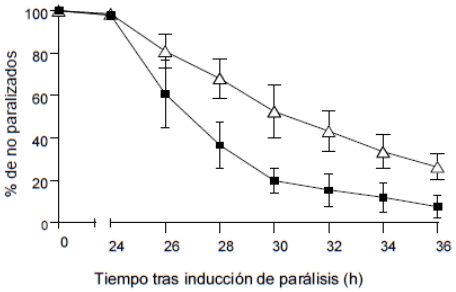


FIG. 2A

ES 3 080 777 A1

DESCRIPCIÓN

Hidrolizados, péptidos, composiciones que los comprenden, y sus usos

SECTOR TÉCNICO

La presente invención pertenece al campo de las enfermedades neurodegenerativas. En concreto, se refiere a péptidos y a hidrolizados y composiciones que los comprenden. Asimismo, se refiere al uso de dichos péptidos, hidrolizados y composiciones en terapia, más particularmente en el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurodegenerativas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que afecta al sistema nervioso central. Es la forma de demencia más prevalente en todo el mundo y afecta a 40 millones de individuos de los aproximadamente 55 millones de personas que padecen demencia.

La EA afecta principalmente a personas mayores de 65 años y la probabilidad de que se les diagnostique la enfermedad aumenta sustancialmente con la edad. Dado que se espera que el porcentaje de personas mayores de 65 años crezca en todo el mundo durante los próximos 40 años, se espera que la incidencia de la EA se duplique con creces. Este aumento en el número esperado de pacientes que presentan la EA representa un área importante de necesidad médica insatisfecha, ya que actualmente no existe un método completamente efectivo para tratar la enfermedad.

La EA se manifiesta con diversos síntomas clínicos, como pérdida de memoria, deterioro cognitivo o disfunción conductual. Además, se han identificado varios factores que contribuyen a la progresión de la EA, como la toxicidad del péptido β-amiloide, el principal componente de las placas β-amiloides extracelulares, la hiperfosforilación de la proteína tau, la pérdida de función colinérgica, serotoninérgica y noradrenérgica, el estrés oxidativo o la disfunción sináptica.

La neuroinflamación también desempeña un papel clave en la EA y otros trastornos neurodegenerativos. Por ejemplo, cuando se produce una respuesta inflamatoria debido a un fallo en la eliminación de los agregados de β-amiloide, se favorece la progresión de las

enfermedades neurodegenerativas. Durante la neuroinflamación, diferentes células del sistema nervioso central, como la microglía y los astrocitos, liberan diferentes citoquinas proinflamatorias y mediadores inflamatorios en la matriz extracelular. Las células microgliales también secretan enzimas citosólicas como la prolil oligopeptidasa (POP) al espacio extracelular. La POP es una serina proteasa conservada distribuida por todo el cuerpo que se expresa en gran medida en el cerebro. Tiene actividades enzimáticas y no enzimáticas y participa en múltiples funciones biológicas. Por ejemplo, interviene en el desarrollo y la descomposición de varios neuropéptidos y hormonas (hormona liberadora de tirotropina, sustancia P, vasopresina, timosina β4, angiotensina I y angiotensina II), que contienen Pro en su secuencia de aminoácidos. Algunas de ellas son reguladoras de las funciones cognitivas. Esta serina proteasa también puede hidrolizar varias proteínas (colágeno y timosina β4) para liberar péptidos antiinflamatorios. Además, la acción de esta enzima parece estar vinculada al proceso inflamatorio, dado que la respuesta inflamatoria desaparece o se reduce cuando esta enzima no está presente o activa. Por otra parte, la enzima POP se ha co-localizado con agregados de amiloide-β (Aβ) en los cerebros post-mortem de pacientes con EA, sugiriendo un papel en la generación de péptidos neurotóxicos. Así, esta enzima se considera una diana biológica para la exploración de múltiples terapias dirigidas a combatir la neurodegeneración mediante su inhibición.

En los últimos años, se ha mostrado que las patas de pollo, un subproducto agroalimentario, pueden ser una buena fuente de péptidos bioactivos (Ibarz-Blanch, N. et al., Chicken Slaughterhouse By-Products: A Source of Protein Hydrolysates to Manage Non-Communicable Diseases. *Trends Food Sci Technol* 2023, 139, 104125, doi:10.1016/J.TIFS.2023.104125). Sabiendo que existe la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos para las enfermedades neurodegenerativas, en particular para la EA, los autores de la presente invención han identificado péptidos inhibidores de POP en hidrolizados de patas de pollo, ayudando así a desarrollar una nueva aplicación de este tipo de hidrolizados y sus subproductos en el campo de la medicina, y en particular en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como, por ejemplo, la EA.

OBJETO DE LA INVENCIÓN

En un **primer aspecto**, la presente invención se refiere a un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO 1-SEQ ID NO 6.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica el péptido del primer aspecto de la invención, opcionalmente el ácido nucleico está unido a una secuencia promotora.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un vector de expresión que comprende el ácido nucleico del segundo aspecto de la invención.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a una célula huésped que comprende el péptido del primer aspecto de la invención, el ácido nucleico del segundo aspecto de la invención y/o el vector del tercer aspecto de la invención.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a un hidrolizado que comprende al menos un péptido según el primer aspecto de la invención.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere a una composición que comprende el péptido del primer aspecto de la invención, el ácido nucleico del segundo aspecto de la invención, el vector del tercer aspecto de la invención, la célula huésped del cuarto aspecto de la invención, y/o el hidrolizado del quinto aspecto de la invención, y uno o más vehículos, diluyentes, solventes, excipientes o aditivos.

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un suplemento alimenticio, medicamento o producto alimenticio caracterizado por comprender el péptido del primer aspecto de la invención, el ácido nucleico del segundo aspecto de la invención, el vector del tercer aspecto de la invención, la célula huésped del cuarto aspecto de la invención, el hidrolizado del quinto aspecto de la invención y/o la composición del sexto aspecto de la invención.

Un **octavo aspecto** de la invención se refiere al péptido del primer aspecto de la invención o a un péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7, al ácido nucleico según una cualquiera de las realizaciones del segundo aspecto de la invención o al ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, al vector según una cualquiera de las realizaciones del tercer aspecto de la invención o al vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, a la célula huésped según una cualquiera de las realizaciones del cuarto aspecto de la invención o a la célula huésped que comprende el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, al hidrolizado según una cualquiera de las realizaciones del quinto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, y/o a la composición según una

cualquiera de las realizaciones del sexto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7 y uno o más vehículos, diluyentes, solventes, excipientes o aditivos, para su uso en terapia o medicina.

Un **noveno aspecto** de la invención se refiere al péptido del primer aspecto de la invención o a un péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7, al ácido nucleico según una cualquiera de las realizaciones del segundo aspecto de la invención o al ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, al vector según una cualquiera de las realizaciones del tercer aspecto de la invención o al vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, a la célula huésped según una cualquiera de las realizaciones del cuarto aspecto de la invención o a la célula huésped que comprende el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, al hidrolizado según una cualquiera de las realizaciones del quinto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, y/o a la composición según una cualquiera de las realizaciones del sexto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7 y uno o más vehículos, diluyentes, solventes, excipientes o aditivos, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa o para su uso como coadyuvante en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa.

Un **décimo aspecto** de la presente invención se refiere a un método para preparar el hidrolizado del quinto aspecto de la invención que comprende las siguientes etapas:

a) Hidrolisis enzimática de proteínas de patas de pollo con una o varias enzimas seleccionadas del grupo formado por proteasas, serinproteasas y aminopeptidasas, en condiciones adecuadas para la(s) enzima(s),

b) Inactivación de la(s) enzima(s).

Un **undécimo aspecto** de la invención se refiere a un hidrolizado obtenible por el método del décimo aspecto de la invención

Un **duodécimo aspecto** de la presente invención se refiere al uso del hidrolizado del quinto o undécimo aspecto de la invención para el consumo directo o como ingrediente en la industria alimentaria o de piensos.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra el efecto de las proteínas de patas de pollo no hidrolizadas (caldo) sobre la parálisis inducida por péptido β amiloide (Aβ) en la cepa mutante CL4176 de *Caenorhabditis elegans*. **(A)** Curva de parálisis inducida por acumulación de Aβ en ausencia (control, cuadrado negro) y presencia de proteínas de patas de pollo no hidrolizadas (caldo a 0,5 mg de proteína/mL, triángulo blanco). **(B)** Área bajo la curva (AUC, del inglés *area under the curve*) de la curva de parálisis inducida por Aβ en la cepa CL4176 de *C. elegans*, normalizada por el AUC del grupo de control. Los datos se expresan como la media de tres experimentos independientes (n = 100 - 150 gusanos por experimento y grupo) ± desviación estándar.

La **Figura 2** muestra el efecto del hidrolizado de patas de pollo CFH2 sobre la parálisis inducida por péptido β-amiloide (Aβ) en la cepa mutante CL4176 *de Caenorhabditis elegans*. **(A)** Curvas de parálisis inducidas por Aβ en ausencia (control, cuadrado negro) y presencia de CFH2 a 5 mg de proteína/mL (triángulo blanco). Diferencias significativas se observaron entre los dos grupos ($p < 0,05$; ANOVA de dos vías; prueba de Bonferroni post-hoc). **(B)** AUC de la curva de parálisis inducida por la expresión de Aβ en *C. elegans*, normalizada por el AUC del grupo de control (datos obtenidos de las curvas representadas en la Figura 1A). Letras diferentes indican diferencias entre los grupos ($p < 0,05$; ANOVA de un factor; prueba de Bonferroni post-hoc). Datos expresados como la media de tres experimentos independientes (n = 100 - 150 gusanos por experimento y grupo) ± desviación estándar.

La **Figura 3A** muestra un cromatograma de HPLC en fase reversa a escala semipreparativa del sobrenadante activo que se obtiene tras la centrifugación y ultrafiltración, a través de una membrana de 3.000 Da de tamaño de poro, del “CFH2” obtenido por hidrólisis enzimática con Protamex® (0,4 unidades Anson/g proteína), 1 h, a 50 °C de proteínas de pata de pollo. F1 – F16 corresponden a las dieciséis (16) fracciones recogidas.

La **Figura 3B** muestra la actividad inhibidora de la prolil oligopeptidasa (iPOP) de las 16 subfracciones obtenidas por HPLC en fase reversa a escala semipreparativa del sobrenadante activo que se obtiene tras la centrifugación y ultrafiltración, a través de una membrana de 3.000 Da de tamaño de poro, del “CFH2”. Los resultados se expresan como la media (n=3) ± desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$; ANOVA de una vía; prueba de Bonferroni post-hoc). Abreviaturas: n.e.: sin efecto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

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

Con el fin de facilitar la comprensión y de aclarar el significado de determinados términos en el contexto de la presente invención se aportan las siguientes definiciones y realizaciones particulares y preferentes de las mismas, aplicables a todas las realizaciones de los distintos aspectos de la presente invención:
El término “enfermedad neurodegenerativa”, tal y como se usa en la presente invención, incluye los procesos crónicos y progresivos que están caracterizados por pérdidas selectivas y simétricas de neuronas en los sistemas motor, sensorial y/o cognitivo.

Ejemplos no limitativos de dicha enfermedad son enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parkinsonismo juvenil, enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal, degeneración corticobasal, encefalopatía traumática crónica, ataxia espinocerebelosa tipo 3/enfermedad de Marchado-Joseph y esquizofrenia.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "prevenir" o "prevención" significa prevenir, reducir el riesgo o retrasar la aparición de síntomas de una condición médica o enfermedad.

"Tratar” o “tratamiento" se refiere a la mejora, reducción o eliminación de síntomas de una condición médica o enfermedad.

La expresión “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad que es eficaz para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad. Dicha cantidad eficaz generalmente producirá una mejora de los signos, síntomas u otros indicadores de una enfermedad.

Un “síntoma” de una enfermedad es cualquier fenómeno mórbido o desviación de lo normal en estructura, función o sensación, experimentado por el sujeto e indicativo de una enfermedad.

“Sujeto” se refiere a cualquier miembro de la clase Mammalia, incluyendo, sin limitación, seres humanos y primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja, tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores, tales como ratones, ratas y cobayas, y similares. El sujeto es, preferentemente, un ser humano.
El término "y/o" significa cualquiera de los artículos, cualquier combinación de los artículos, o todos los artículos con los que se asocia este término.

Los autores de la presente invención han caracterizado distintos péptidos con actividad iPOP (ver Ejemplo 4). Dicha actividad iPOP se considera útil para la prevención y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Así, en un **primer aspecto**, la presente invención se refiere a un péptido que consiste en una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6.

En una realización particular, el péptido es un péptido aislado o un péptido puro. Preferiblemente, el péptido es al menos 95% puro, o al menos 99% puro, es decir, libre de impurezas.

En una realización particular, según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, el péptido tiene actividad iPOP *in vitro*, más particularmente tiene actividad iPOP igual o superior al 22% cuando se ensaya a 0,1 mg/mL siguiendo el método descrito en el Ejemplo 2.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un ácido nucleico que codifica el péptido del primer aspecto de la invención, opcionalmente el ácido nucleico está unido a una secuencia promotora. Los métodos para definir la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico a partir de la secuencia del péptido de la invención son bien conocidos por el experto en la materia. Igualmente, las secuencias promotoras son bien conocidas por el experto en la materia

El ácido nucleico del segundo aspecto de la invención puede estar comprendido en un vector. Así, un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un vector que comprende el ácido nucleico del segundo aspecto de la invención.

El término "vector" como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que se ha unido. El término incluye el vector como

una estructura de ácido nucleico auto-replicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se unen operativamente. Tales vectores se denominan en la presente como "vectores de expresión". Así, en una realización preferente de la invención, el vector es un vector de expresión.

El vector del tercer aspecto de la invención puede introducirse en una célula huésped. Así, un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a una célula huésped que comprende el péptido del primer aspecto de la invención, el ácido nucleico del segundo aspecto de la invención y/o el vector del tercer aspecto de la invención. Preferentemente, la célula huésped es una célula huésped recombinante.

El término "célula huésped" se usa de forma indistinta a "línea celular huésped" o "cultivo celular huésped" y todos ellos se refieren a células en las que se ha introducido un ácido nucleico exógeno, incluyendo la progenie de tales células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen las células primarias transformadas y la progenie derivada de ellas sin tener en cuenta el número de pasajes. Los métodos de transformación de las células huésped son bien conocidos por los expertos en la materia.
La célula huésped puede ser procariota o eucariota. La célula huésped procariota es preferiblemente bacteriana. Las células huésped eucariotas preferidas incluyen células de levadura, de insecto y de mamífero, preferentemente células de vertebrados (como, por ejemplo, de ratón, rata o mono) o líneas celulares humanas (como, por ejemplo, fibroblásticas o de colon). Más preferiblemente, la célula huésped es una levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*.

Los autores de la presente invención han caracterizado distintos hidrolizados proteicos de patas de pollo que tienen actividad iPOP (ver Ejemplo 2), los cuales son capaces de retrasar significativamente la parálisis causada por la acumulación de Aβ (ver Ejemplo 3). Así, un **quinto aspecto** de la invención se refiere a un hidrolizado que comprende al menos un péptido según el primer aspecto de la invención, así el hidrolizado puede comprender un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1-6 o combinaciones de estos. En una realización particular, el hidrolizado comprende uno, varios (dos, tres, cuatro o cinco) o todos los péptidos de secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 6. Más particularmente, el hidrolizado comprende SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2, y opcionalmente uno, dos, tres o cuatro péptidos de secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 6. Preferentemente, el hidrolizado comprende los seis péptidos de SEQ

ID NO: 1-6, como es el caso del hidrolizado CH2 que muestra una alta actividad iPOP (ver Tabla I).

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones del quinto aspecto de la invención, el hidrolizado también comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7.

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones del quinto aspecto de la invención, el hidrolizado tiene actividad iPOP *in vitro*, más particularmente tiene una actividad iPOP igual o superior al 50%, preferentemente igual o superior al 60%, cuando se ensaya a 0,2 mg producto seco/mL siguiendo el método descrito en el Ejemplo 2.

El péptido, ácido nucleico, vector, célula huésped e hidrolizado de la invención se pueden formular en distintos tipos de composiciones. Así, un **sexto aspecto** de la invención se refiere a una composición que comprende el péptido del primer aspecto de la invención, el ácido nucleico del segundo aspecto de la invención, el vector del tercer aspecto de la invención, la célula huésped del cuarto aspecto de la invención, y/o el hidrolizado del quinto aspecto de la invención, y uno o más vehículos, diluyentes, solventes, excipientes o aditivos.

En una realización particular del sexto aspecto de la invención, la composición consiste o consiste esencialmente en el péptido del primer aspecto de la invención, el ácido nucleico del segundo aspecto de la invención, el vector del tercer aspecto de la invención, la célula huésped del cuarto aspecto de la invención, y/o el hidrolizado del quinto aspecto de la invención, y uno o más vehículos, diluyentes, solventes, excipientes o aditivos.

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la composición es una composición nutracéutica, farmacéutica, o alimenticia.

Los vehículos, diluyentes, solventes, excipientes o aditivos son ampliamente conocidos por el experto en la materia, quien sabe cuál(es) elegir según el tipo de composición y la forma de administración deseada. Por ejemplo, los excipientes y sales farmacéuticamente aceptables pueden ser los descritos en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ª edición. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mack Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985 y ediciones más recientes, y en la *Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology*.

Tanto el hidrolizado como el péptido, ácido nucleico, vector, célula huésped y composición de la invención se pueden formular como suplementos alimenticios, medicamentos o productos

alimenticios. Así, un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un suplemento alimenticio, medicamento o producto alimenticio caracterizado porque comprende el péptido del primer aspecto de la invención, el ácido nucleico del segundo aspecto de la invención, el vector del tercer aspecto de la invención, la célula huésped del cuarto aspecto de la invención, el hidrolizado del quinto aspecto de la invención y/o la composición del sexto aspecto de la invención.

"Producto alimenticio" es sinónimo de alimento. Así, se refiere a toda sustancia o producto de cualquier naturaleza, sólido o líquido, natural o transformado (entera o parcialmente), que por sus características, aplicación, componentes, preparación y estado de conservación es susceptible de utilizarse, habitualmente o idóneamente, para la normal alimentación humana o bien como fruitivo, o, en casos especiales, para una alimentación dirigida.

"Producto alimenticio funcional" se refiere a un producto alimenticio que afecta beneficiosamente a una o más funciones diana en el organismo, más allá de los efectos nutricionales adecuados, de manera relevante para mejorar el estado de salud y bienestar y/o reducir el riesgo de enfermedad. Se consume como parte de un patrón alimentario normal. No es una píldora, una cápsula ni ninguna forma de suplemento dietético.

"Suplemento (o complemento) alimenticio" se refiere a cualquier producto alimenticio cuyo fin es completar la dieta normal. Consisten en fuentes concentradas de nutrientes (e.g., vitaminas, minerales) o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada (es decir cápsulas, pastillas, tabletas, píldoras, bolsitas de polvos, ampollas de líquidos u otras formas similares), que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias.

Para ser formulado como un medicamento o suplemento alimenticio, el péptido, ácido nucleico, vector, célula huésped, hidrolizado, y/o composición de la invención, se puede(n) combinar con cualquier portador, diluyente, adyuvante, excipiente, etc. adecuado, para obtener el medicamento en la forma de administración deseada. Así, pueden presentarse en cualquier forma de administración, sólida, gel, o líquida. El medicamento puede administrarse por cualquier vía apropiada, oral, parenteral, respiratoria, rectal o tópica. Ejemplos de dichas formulaciones, que pueden ser preparadas usando métodos y excipientes bien conocidos, tales como los descritos en, "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook" Mack Pub. Co., N.Y. U.S.A., son comprimidos, cápsulas, jarabes y similares para administración oral, mientras que para administración parenteral las formas adecuadas son, por ejemplo,

soluciones estériles o suspensiones en líquidos aceptables.

Ventajosamente, el medicamento o suplemento alimenticio se administra por vía oral.

Para ser formulado como producto alimenticio, el péptido, ácido nucleico, vector, célula huésped, hidrolizado, y/o composición de la invención, se puede(n) combinar con cualquier ingrediente alimentario común o añadir a cualquier alimento. En una realización particular, el producto alimenticio está en forma de bebida. “Bebida” pretende incluir líquidos y jarabes, al igual que formulaciones en polvo para ser disueltas en agua u otro componente líquido para la preparación de bebidas instantáneas.

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones del séptimo aspecto de la invención, el producto alimenticio es una bebida seleccionada del grupo formada por agua, agua gelificada, una bebida láctea, una bebida vegetal, una bebida fermentada, una bebida energética, un caldo, un refresco, un zumo, un *smoothie* o un batido.

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones del séptimo aspecto de la invención, el producto alimenticio es una barrita, un producto lácteo, una gelatina, un pudín, un producto extrusionado, un producto de panadería, un producto cárnico, un puré o un alimento texturizado.

Como se muestra en los Ejemplos 2 y 3, el hidrolizado de la invención tiene actividad iPOP *in vitro* y muestra un efecto neuroprotector en un modelo de parálisis inducida por acumulación de péptido Aβ. Además, en el Ejemplo 4 se muestra que también los péptidos de secuencia SEQ ID NO: 1-7 tienen actividad iPOP *in vitro.* Gracias a dicha actividad iPOP, tanto los péptidos como los hidrolizados de la invención pueden utilizarse en medicina, en particular para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa. Así, en un **octavo aspecto**, la presente invención se refiere al péptido según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención o un péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7, al ácido nucleico según una cualquiera de las realizaciones del segundo aspecto de la invención o al ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, al vector según una cualquiera de las realizaciones del tercer aspecto de la invención o al vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, a la célula huésped según una cualquiera de las realizaciones del cuarto aspecto de la invención o a la célula huésped que comprende el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, al hidrolizado según una cualquiera de las realizaciones

del quinto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, y/o a la composición según una cualquiera de las realizaciones del sexto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7 y uno o más vehículos, diluyentes, solventes, excipientes o aditivos, para su uso en terapia o medicina.

Asimismo, el octavo aspecto de la invención se refiere al uso del péptido según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención o de un péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7, del ácido nucleico según una cualquiera de las realizaciones del segundo aspecto de la invención o del ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, del vector según una cualquiera de las realizaciones del tercer aspecto de la invención o del vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, de la célula huésped según una cualquiera de las realizaciones del cuarto aspecto de la invención o de la célula huésped que comprende el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, del hidrolizado según una cualquiera de las realizaciones del quinto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, y/o la composición según una cualquiera de las realizaciones del sexto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7 y uno o más vehículos, diluyentes, solventes, excipientes o aditivos, para preparar un medicamento, una composición nutracéutica, un producto alimenticio funcional, o un suplemento alimenticio. En una realización particular, dicha composición nutracéutica, producto o suplemento puede usarse como adyuvante, particularmente coadyuvante en terapia o medicina.

Como se ha indicado anteriormente, el péptido e hidrolizado de la invención tienen actividad iPOP pudiéndose utilizar para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa. Así, un **noveno aspecto** de la invención se refiere al péptido según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención o un péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7, al ácido nucleico según una cualquiera de las realizaciones del segundo aspecto de la invención o al ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, al vector según una cualquiera de las realizaciones del tercer aspecto de la invención o al vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, a la célula huésped según una cualquiera de las realizaciones del cuarto aspecto de la invención o a la célula huésped que comprende el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, al hidrolizado según una cualquiera de las realizaciones del quinto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, y/o a la composición según una cualquiera de las realizaciones del sexto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7 y

uno o más vehículos, diluyentes, solventes, excipientes o aditivos, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa.

El noveno aspecto de la invención se refiere también al péptido según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención o un péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7, al ácido nucleico según una cualquiera de las realizaciones del segundo aspecto de la invención o al ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, al vector según una cualquiera de las realizaciones del tercer aspecto de la invención o al vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, a la célula huésped según una cualquiera de las realizaciones del cuarto aspecto de la invención o a la célula huésped que comprende el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, al hidrolizado según una cualquiera de las realizaciones del quinto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, y/o a la composición según una cualquiera de las realizaciones del sexto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7 y uno o más vehículos, diluyentes, solventes, excipientes o aditivos, para su uso como coadyuvante en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa.

Asimismo, el noveno aspecto de la invención se refiere al uso del péptido según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención o de un péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7, del ácido nucleico según una cualquiera de las realizaciones del segundo aspecto de la invención o del ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, del vector según una cualquiera de las realizaciones del tercer aspecto de la invención o del vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, de la célula huésped según una cualquiera de las realizaciones del cuarto aspecto de la invención o de la célula huésped que comprende el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, del hidrolizado según una cualquiera de las realizaciones del quinto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, y/o de la composición según una cualquiera de las realizaciones del sexto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7 y uno o más vehículos, diluyentes, solventes, excipientes o aditivos, para la preparación de un medicamento, coadyuvante, composición nutracéutica, producto alimenticio funcional, o suplemento alimenticio, para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa.

El noveno aspecto de la invención se refiere también a un método para tratar y/o prevenir una

enfermedad neurodegenerativa en un sujeto (mamífero, preferentemente humano), que comprende la administración, preferentemente de una cantidad eficaz, a dicho sujeto del péptido según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención o de un péptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7, del ácido nucleico según una cualquiera de las realizaciones del segundo aspecto de la invención o del ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, del vector según una cualquiera de las realizaciones del tercer aspecto de la invención o del vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, de la célula huésped según una cualquiera de las realizaciones del cuarto aspecto de la invención o de la célula huésped que comprende el vector que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, del hidrolizado según una cualquiera de las realizaciones del quinto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7, y/o de la composición según una cualquiera de las realizaciones del sexto aspecto de la invención o que comprende el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7 y uno o más vehículos, diluyentes, solventes, excipientes o aditivos. Más particularmente, el método es para tratar y/o prevenir una enfermedad neurodegenerativa donde el péptido, ácido nucleico, vector, célula huésped, hidrolizado o composición se administra como coadyuvante.

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el método es para prevenir y la cantidad eficaz es una cantidad profilácticamente eficaz. “Cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad que, al ser administrada, previene, reduce el riesgo o retrasa la aparición de síntomas de una condición médica o enfermedad.

En otra realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el método es para tratar y la cantidad eficaz es una cantidad terapéuticamente eficaz. "Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que, al ser administrada, recude o elimina síntomas de una condición médica o enfermedad.

En una realización preferente según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la administración se lleva a cabo por vía oral. La posología dependerá de varios factores tales como peso del sujeto, sexo, tipo y gravedad de las condiciones a ser tratadas, etc. y será fácilmente determinada por el profesional experto.

Los usos y métodos descritos en el octavo y el noveno aspecto de la invención en los que se usan o administran los hidrolizados de patas de pollo o composiciones que los comprenden, suponen una gran ventaja ya que son ingredientes de origen natural que carecen de toxicidad

o tienen una toxicidad mínima.

Las realizaciones particulares de los aspectos primero a sexto son aplicables al péptido de SEQ ID NO: 7, al ácido nucleico que lo comprende, al vector que comprende dicho ácido nucleico, al hidrolizado y la composición que comprenden dicho péptido.

Un **décimo aspecto** de la invención se refiere al método para obtener un hidrolizado según se define en una cualquiera de las realizaciones del quinto aspecto de la invención. En particular, el método comprende las siguientes etapas:

a) Hidrólisis enzimática de una solución proteica de patas de pollo con una o varias enzimas seleccionadas del grupo formado por proteasa, serinproteasa y aminopeptidasa, en condiciones adecuadas para la(s) enzima(s) seleccionada(s);
b) Inactivación de la enzima.

En una realización particular del décimo aspecto de la invención, la solución proteica de patas de pollo se prepara triturando las patas de pollo, añadiendo agua, calentando la solución y eliminando las partículas no solubles (etapa a1, previa a la etapa a)). Más particularmente, la solución de agua con las patas de pollo trituradas se calienta a una temperatura superior a 40 ºC, preferentemente de 80 ºC a 100 ºC, más preferiblemente a 100 ºC. El tiempo de calentamiento es fácilmente determinable por el experto en la materia. En una realización particular, la solución se calienta durante de 0,5 h a 2 h, preferiblemente durante 1 h. Las partículas no solubles se pueden eliminar por centrifugación, por ejemplo, a 1.250 x *g* durante 5 min, y posteriormente se recoge el sobrenadante con la solución proteica.

En una realización particular del décimo aspecto de la invención, la etapa a) se lleva a cabo con una o varias enzimas de uso alimentario, más particularmente seleccionadas del grupo formado por:

- proteasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, preferentemente E.C. 3.4.24.28,
- serinproteasa de *Bacillus licheniformis*, preferentemente E.C. 3.4.21.62,
- serinproteasa de *Fusarium oxysporum*, preferentemente E.C. 3.4.21.4 y
- aminopeptidasa de *Aspergillus oyzae*, preferentemente E.C. 3.4.11.1.

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la enzima es una combinación de la proteasa y serinproteasas arriba mencionadas. Preferentemente, la enzima es una combinación de proteasas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus*

amyloliquefaciens (E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28) o es una serinproteasa de *Fusarium oxysporum* (E.C. 3.4.21.4).

Enzimas comerciales de estos tipos en la fecha de la presente solicitud son, por ejemplo, los siguientes: Protamex® (Novozymes) que son las enzimas proteolíticas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* (E.C. 3.4.2 1.62 y E.C. 3.4.24.28), y Formea® (Novozymes) que es una serinproteasa de *Fusarium oxysporum* (E.C. 3.4.21.4). Así, en una realización preferida el enzima proteolítico es Protamex® o Formea®.

Las condiciones de hidrólisis son determinables por el experto en la materia. En cuanto al pH, en una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la temperatura de la hidrólisis es de 5 a 8, preferentemente de 6 a 8. En cuanto a la temperatura, en una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la temperatura de la hidrólisis es de 20 ºC a 60 ºC, más particularmente de 25 ºC a 50 ºC. En cuanto al tiempo, en una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la hidrólisis se lleva a cabo de 0,5 h a 12 h, preferentemente de 1 h a 4 h. En una realización preferida según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la hidrólisis se lleva a cabo con una combinación de proteasas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* (E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28) o con serinproteasa de *Fusarium oxysporum* (E.C. 3.4.21.4), a una temperatura de 50 ºC, durante 1 h, pH 7. Tal y como se muestra en el Ejemplo 3, estas condiciones resultan en hidrolizados con una actividad iPOP superior al 73%. En cuanto a la etapa b), la inactivación de la enzima se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, como, por ejemplo, por bajada de pH (por ejemplo, bajada a pH 3-4), por calentamiento (por ejemplo, calentamiento a 80 ºC-100 ºC, durante 5-15 minutos) o por filtración.

Como se muestra en los ejemplos, el hidrolizado de la presente invención tiene una actividad iPOP superior al 45% y tiene una excelente actividad neuroprotectora *in vivo*. Así, en una realización particular, tras la etapa b) el método incluye las siguientes etapas:

c) Evaluación de la actividad iPOP; y
d) Selección de un hidrolizado con una actividad iPOP *in vitro* igual o superior al 45% a una concentración de 0,2 mg producto seco/mL.

En cuanto a la etapa c), en una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el método para evaluar o medir la actividad iPOP es el método utilizado en el Ejemplo 2.

En cuanto a la etapa d), en una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, se elige un hidrolizado con una actividad iPOP igual o superior al 60%, preferentemente igual o mayor del 70%.

En una realización particular, el método comprende adicionalmente una etapa e), en la que el hidrolizado obtenido en la etapa b) o d) se deseca, preferentemente por calor en estufa, horno, liofilizador o atomizador.

En una realización particular del método de la invención, el método consiste o consiste esencialmente en las etapas a)-b), y opcionalmente las etapas c)-d) o las etapas c)-e) o la etapa e), tal y como se definen en cualquiera de las realizaciones descritas en los párrafos anteriores. En una realización preferente, el método consiste o consiste esencialmente en las etapas a)-d), y opcionalmente e), tal y como se definen en cualquiera de las realizaciones descritas en los párrafos anteriores.

Como se ha indicado anteriormente, la materia prima para preparar el hidrolizado de la invención son patas de pollo, que son un subproducto de la industria cárnica. Así, el método de producción del hidrolizado de la presente invención es un método barato y fácil de industrializar, que permite utilizar y revalorizar un subproducto industrial normalmente desechado.

En un **undécimo aspecto**, la invención se refiere a un hidrolizado obtenible por el método según una cualquiera de las realizaciones del décimo aspecto de la invención. Igualmente, se refiere a dicho hidrolizado para su uso en medicina, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa y para su uso como coadyuvante en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa. También se refiere a una composición que comprende dicho hidrolizado, y uno o más vehículos, diluyentes, solventes, excipientes o aditivos, preferentemente la composición es una composición nutracéutica, farmacéutica, o alimenticia. Igualmente, se refiere a un medicamento, suplemento alimenticio, producto alimenticio que comprende dicho hidrolizado. Las realizaciones particulares de los aspectos del quinto al noveno son aplicables al undécimo aspecto de la presente invención.

Por último, un **duodécimo aspecto** de la presente invención se refiere al uso del hidrolizado del quinto o undécimo aspecto de la invención para el consumo directo o como ingrediente en la industria alimentaria o de piensos.

EJEMPLOS

Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo, aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos. Todos los procedimientos realizados en los animales de los siguientes ejemplos fueron aprobados por el Comité Ético de la Universitat Rovira i Virgili.

Ejemplo 1. Hidrolizados

Ejemplo 1. Procedimiento de elaboración de los hidrolizados proteicos a partir de patas de pollo

Las patas de pollo (*Gallus gallus*) se limpiaron y molieron con una picadora de carne (Moulinex, Barcelona, España). El triturado se mezcló con agua Milli-Q (0,25 g/mL, p/v) y la solución se calentó a una temperatura de 100 ºC durante 1 h. Posteriormente, las partículas no solubles se eliminaron por centrifugación a 1.250 x *g* durante 5 min y se recogió el sobrenadante. Las proteínas solubles en el sobrenadante se hidrolizaron después por la adición de las soluciones enzimáticas Protamex® (0.1 y 0.4 AU (Unidades Anson)/g proteína), Formea® (25 y 100 KMTU (Unidad kilo de tripsina microbiana)/g proteína o Flavoruzyme® (20 y 80 LAPU (Unidad de Leucina aminopeptidasa)/g proteína) durante 1 h a 50 ºC, pH 7 y 250 rpm (ver Tabla I en el Ejemplo 2). Las enzimas se inactivaron calentando a 90 ºC durante 15 min.

Protamex® corresponde a las enzimas proteolíticas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* (E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28), Flavourzyme® es una aminopeptidasa de *Aspergillus oryzae* (E.C. 3.4.11.1) y Formea® es una serinproteasa de *Fusarium oxysporum* (E.C. 3.4.21.4).

Ejemplo 2. Evaluación de la actividad inhibitoria de la POP de los hidrolizados proteicos

La actividad inhibidora de la prolil oligopeptidasa (POP) de los hidrolizados proteicos obtenidos en el Ejemplo 1 se determinó utilizando el kit de ensayo de prolil oligopeptidasa fluorogénico (referencia P48147, BPS Bioscence), añadiendo 10 µL de muestra y siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración final de lo hidrolizados en el pocillo fue de 0,2 mg producto seco/mL (p/v). La fluorescencia se midió a λex=360 nm y λem=460 nm.
El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$Inhibición\ \text{POP}\ (\%)\ = \frac{(F_{\text{Control}} - F_{Blanco}) - (F_{muestra} - F_{Blanco\ muestra})}{F_{Control} - F_{Blanco}} * 100$$

donde $F_{control}$ es la fluorescencia producida por la acción de la enzima en ausencia de muestra (100% de actividad), F_{blanco} es la fluorescencia de los reactivos en ausencia de enzima y muestra (0% de actividad), $F_{muestra}$ es la fluorescencia producida por la acción de la enzima en presencia de la muestra, y $F_{blanco\ muestra}$ es la fluorescencia de los reactivos y la muestra en ausencia de enzima. Los datos se expresaron como media (n=3) ± desviación estándar (**Tabla I**).

Tabla I

Hidrolizado	Enzima	Relación enzima/sustrato	Actividad iPOP (%*)
CFH1	Protamex®	0,1 UA/g prot	60,6 ± 3,6
CFH2	Protamex®	0,4 UA/g prot	73,9 ± 7,4
CFH3	Formea®	25 KMTU/g prot	76,4 ± 4,3
CFH4	Formea®	100 KMTU/g prot	59,2 ± 1,5
CFH5	Flavourzyme®	20 LAPU/g prot	55,3 ± 1,3
CFH6	Flavourzyme®	80 LAPU/g prot	51,0 ± 5,0

*Porcentage obtenido a una concentración de 0,2 mg/mL

La actividad de iPOP de los hidrolizados osciló entre 51% y 76,4% cuando se probaron a 0,2 mg producto seco/mL. Los hidrolizados con mayor actividad iPOP fueron CFH2 y CFH3, con 73,9% y 76,4% de inhibición, respectivamente.

El IC_{50} (concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad enzimática) se determinó para los hidrolizados CFH2 y CFH3 y se expresó como µg de proteína o producto liofilizado/ mL (p/v). El contenido de proteína se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (kit BCA, Thermo Fisher Scientific). Los valores de IC_{50} fueron de 57,9 y 40,1 µg de proteína/mL para CFH2 y CFH3, respectivamente.

Ejemplo 3. Evaluación del efecto del hidrolizado CFH2 en un modelo de parálisis inducido por acumulación de péptido Aβ

Los efectos neuroprotectores del hidrolizado CFH2 y las proteínas de pata de pollo no hidrolizadas se evaluaron mediante un modelo de parálisis inducida por acumulación de péptido Aβ en la cepa CL4176 *de C. elegans.*

3.1 *Mantenimiento de los gusanos*

La cepa mutante *de C. elegans* CL4176 y la cepa *OP50* de *E. coli* se obtuvieron del Centro de Genética de *Caenorhabditis* de la Universidad de Minnesota (Minneapolis, MN, EE.UU.). Los gusanos se descongelaron y propagaron a 16 ºC en placas de agar en medio de crecimiento de nematodos (NGM) suplementadas con 0,1% de $CaCl_2$ 1 M, 0,1% de colesterol (disuelto en etanol), 0,1 % de $MgSO_4$ 1 M, tampón de fosfato al 2,5% 1 M pH 6, ampicilina de sodio al 0,1% y nistatina al 0,18% (disuelto en etanol), y se sembró *E. coli* OP50 como fuente de alimento.

3.2 *Ensayo de parálisis*

El ensayo de parálisis del gusano se llevó a cabo según Ayuda-Durán et al., 2024 (Insights into the Neuroprotective Potential of Epicatechin: Effects against Aβ-Induced Toxicity in *Caenorhabditis Elegans*. *Antioxidants* **2024**, *13*, 79, doi:10.3390/ANTIOX13010079/S1). Los gusanos adultos grávidos (6-7 individuos) se transfirieron a placas frescas de agar NGM que contenían *E. coli* OP50 y el hidrolizado CFH2 (5 mg de proteína mL (p/v)), o las proteínas de pata de pollo no hidrolizadas (5 mg de proteína/mL, p/v). Se utilizaron como control negativo nemátodos que crecieron en placas de agar que no contenían ningún tratamiento. El contenido proteico de las muestras se determinó por el método de Kjeldahl, utilizando 6,25 como factor de conversión proteica. Los nematodos se retiraron a las 24 h y los huevos se dejaron eclosionar en las placas a 16 ºC. Una vez que las larvas alcanzaron la etapa adulta (48 h después de la liberación de los huevos), las placas que contenían nematodos se transfirieron de 16 a 25 ºC para inducir la síntesis Aβ1-42 durante 24 h (n=100-150 por grupo). Posteriormente, se cuantificó el número de gusanos no paralizados en las distintas placas de crecimiento durante 12 h en intervalos de 2 h. Se consideró la parálisis si los gusanos no movían sus cuerpos o solo inclinaban la cabeza al entrar en contacto con estímulos usando un alambre de platino. El porcentaje de gusanos móviles (no paralizados) se calculó en tres experimentos independientes para cada tratamiento (media ± desviación estándar) y se representó a lo largo del tiempo. También se calculó el área bajo la curva (AUC) y se normalizó respecto a la del grupo control.

En todos los grupos ensayados, se observaron los primeros gusanos paralizados a las 26 h después de la inducción de la síntesis de péptidos Aβ por la subida de temperatura. El grupo control (no tratados) y los nematodos tratados con las proteínas no hidrolizadas (5 mg de proteína/mL, caldo) mostraron un comportamiento similar a lo largo del tiempo, observándose

un 90,2% y 90,1% de nemátodos paralizados 36 h después de la inducción de la síntesis de Aβ, respectivamente (**Figura 1A**). No se observaron diferencias significativas cuando se calculó el AUC para ambos grupos (**Figura 1B**; p = 0,19), por lo que el tratamiento con las proteínas no hidrolizadas no previene la parálisis de los gusanos.

El tratamiento con el hidrolizado CFH2 a todas las dosis probadas retrasó significativamente la parálisis del gusano causada por la acumulación de Aβ en comparación con el grupo no tratado (p < 0,05; ANOVA de dos vías; post-hoc: prueba de Bonferroni) (**Figura 2**). El mayor efecto se observó a las 30 h después de la inducción de la parálisis, observándose un 32,6% de gusanos paralizados menos a 5 mg de proteína/mL de CFH2, respectivamente, en comparación con el grupo control (**Figura 2A**). Al final del experimento (36 h), el tratamiento con el CFH2 disminuyó el número de gusanos paralizados en un 20% en comparación con el grupo control (**Figura 2B**).

Ejemplo 4. Identificación de los péptidos del hidrolizado CFH2 y actividad iPOP

4.1 Aislamiento de los péptidos del hidrolizado CFH2

Para la identificación de los péptidos del hidrolizado CFH2, se utilizó una membrana de corte de 3 kDa usando unidades de filtración Amicon® Ultra 15. El permeado (fracción menor de 3000 Da) obtenido se recogió, liofilizó y guardó -20ºC hasta su posterior fraccionamiento.
Los péptidos contenidos en la fracción liofilizada de <3 kDa, reconstituida en agua Milli-Q (10 mg/mL, p/v)), se fraccionaron mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) utilizando las condiciones y equipos semipreparativos descritos por Bravo et al., 2019 (Novel Antihypertensive Peptides Derived from Chicken Foot Proteins. *Mol Nutr Food Res* **2019**, *63*, 1801176, doi:10.1002/mnfr.201801176), con los siguientes cambios: i) gradiente de elución: 0 a 23,5% B en 59,2 min, 23,5-90% B en 5,8 min y 90-0% B en 2 min, y ii) volumen de inyección: 750 µL. Durante la separación cromatográfica se recogieron 16 fracciones peptídicas (F1-F16) que se liofilizaron y se almacenaron a -20 ºC. Posteriormente, se evaluó la actividad iPOP de las fracciones a una concentración de 10 µg de proteína/mL (p/v) mediante el método descrito en el Ejemplo 3. El contenido proteico de estas fracciones reconstituidas se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La **Figura 3A** muestra el cromatograma obtenido por RP-HPLC, revelando una mezcla compleja de péptidos. La actividad de iPOP de las 16 fracciones osciló entre 0 y 83% cuando

se determinó a 0,01 mg de proteína/mL (**Figura 3B**). La fracción F15 mostró la mayor bioactividad, con una inhibición de la POP del 82,9% seguidas de las fracciones F16 y F9 (49,2 y 47,6%, respectivamente). El IC_{50} obtenido para la fracción F15 fue 1,7 µg de proteína/mL.

4.2 Identificación de los péptidos del hidrolizado CFH2

En primer lugar, se procedió a desalinizar y concentrar los péptidos de la subfracción (reconstituida en agua Milli-Q conteniendo un 0,1% de ácido fórmico) utilizando una columna Oasis HLB SPE y un concentrador SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, CA, EE. UU.). Posteriormente, los péptidos se separaron por cromatografía líquida utilizando un Vanquish Flex VF-P20-A (Thermo Fisher Scientific) con una columna Acquity Premier CSH C18 (150 mm x 2,1 mm de diámetro interior, tamaño de partícula de 1,7 µm; Waters). La separación se realizó con un gradiente de 100 min utilizando agua Milli-Q conteniendo 0,1% de ácido fórmico (fase A) y acetonitrilo conteniendo 0,1% de ácido fórmico (fase B) a un flujo de 0,25 mL/min. El análisis de espectrometría de masas se realizó en un Orbitrap Eclipse (Thermo Fisher Scientific) utilizando un espectro MS de resolución FT mejorada (R = 60,000 FHMW) seguido de una adquisición FT-MS / MS dependiente de datos (R = 15,000 FHMW, 30% de energía de colisión normalizada HCD) de los diez iones padres más intensos con una adquisición de estado de carga de uno a siete y exclusión dinámica de 0,7 min.

La identificación/cuantificación de proteínas se realizó utilizando Proteome Discoverer v.2.5 (Thermo Fisher Scientific) y el motor de búsqueda Mascot (v2.8, Matrix Science). Para la identificación de proteínas, se utilizó el nodo Mascot con el proteoma de *Gallus gallus,* asumiendo que no había digestión enzimática. La tolerancia a la masa de los iones fragmentados se estableció en 20 mili unidades de masa (mmu) para la fragmentación FT-MS/MS y 10,0 ppm de error para la masa de iones primarios de FT-MS. La oxidación de la metionina y la acetilación del N-terminal se establecieron como modificaciones dinámicas. La tasa de descubrimientos falsos (FDR) para la identificación de los péptidos se fijó en un máximo del 1%. Los datos de cuantificación de péptidos se obtuvieron con el nodo 'Precursor ions quantifier' del Proteome Discoverer utilizando los parámetros de péptidos únicos y razor. Solo se utilizaron aquellas MS/MS con un promedio de 10 señal-ruido, y la cantidad total de péptidos se utilizó como modo de normalización. Se realizó una verificación visual de los espectros de fragmentación y solo se consideraron los péptidos encontrados en ambas réplicas.

En la **Tabla II** se muestran los ocho péptidos identificados en la subfracción F15, los cuales estaban formados por entre 7-12 aminoácidos. Las secuencias aminoacídicas fueron encontradas en diferentes tipos de proteínas (**Tabla II**).

Tabla II. Péptidos identificados en la fracción F15 obtenida por HPLC en fase reversa a partir del hidrolizado CFH2

Secuencia[a]	**Proteína nativa**	**Masa (Da)**	**z**	***m/z* (da)**	**Abundancia relativa**
PLRGPAL	TRPC4-AP	723,44	1	723,44	6,85E+09
NLADDIMR	Vimentina	947,46	1	947,46	7,24E+08
LPGLGAL	Fosfatasa inductora de fase M	640,40	1	640,40	4,54E+08
LPGALGL	Proteína de dedo de zinc 703	640,40	1	640,40	2,74E+08
VGDPNWFPK	Transgelina	1.060,53	2	530,27	2,42E+08
SADPEPGPGIDL	Catelicidina-2	1.168,56	2	584,28	1,95E+08
GERGFPGLPGPS	Cadena alfa 1 de colágeno tipo I	1.170,59	1	1.170,59	1,29E+08
IDTWEKPF	Proteína de unión al miembro de la familia ABI 3	1.036,52	2	518,26	1,25E+08

[a]Aminoácidos mostrados por sus códigos de una letra.

4.3 Evaluación de la actividad de los péptidos identificados

Los péptidos de la invención se sintetizaron químicamente (Alianpeptide, Shanghai, China) y se obtuvieron preparados con los valores de pureza mostrados en la **Tabla III**. Una vez sintetizados se les determinó su actividad iPOP con el fin de conocer cuál o cuáles de los péptidos identificados en la subfracción F15 eran el o los responsables de dicha actividad en la fracción. Para ello, los péptidos se reconstituyeron en agua Milli-Q. La actividad iPOP de los péptidos se determinó según el protocolo descrito en el Ejemplo 2. En la **Tabla III** se muestran los porcentajes de inhibición mostrados por los diferentes péptidos identificados en la subfracción F15 a una concentración de 0.1 mg proteína/mL. A la concentración ensayada, todos los péptidos mostraron una cierta actividad iPOP (25-66%) siendo las secuencias VGDPNWFPK (SEQ ID NO: 2) y IDTWEKPF (SEQ ID NO: 1) las que presentaron más actividad, aproximadamente 65% y 66%, respectivamente. Para estos dos péptidos, se determinó también el IC_{50} siendo de 16,0 µM y 6,4 µM respectivamente.

Tabla III. Actividad inhibitoria de la prolil oligopeptidasa (iPOP) de los péptidos sintetizados (% e IC_{50} ± SD).

SEQ ID NO	SECUENCIA	Actividad iPOP	
		%	IC_{50} (µM)
1	IDTWEKPF	65,6 ± 0,6	6,4 ± 0,5
2	VGDPNWFPK	65,0 ± 1,3	16,0 ± 1,1
3	NLADDIMR	52,6 ± 5,3	-
4	LPGLGAL	40,8 ± 0,7	-
5	LPGALGL	32,0 ± 3,1	-
6	SADPEPGPGIDL	25,9 ± 3,2	-
7	GERGFPGLPGPS	38,7 ± 2,2	-

REIVINDICACIONES

1. Hidrolizado de patas de pollo que comprende al menos un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6, para su uso en medicina.

2. Hidrolizado de patas de pollo como se ha definido en la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa.

3. Hidrolizado para su uso según la reivindicación 2, donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo formado por enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parkinsonismo juvenil, enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal, degeneración corticobasal, encefalopatía traumática crónica, ataxia espinocerebelosa tipo 3/enfermedad de Marchado-Joseph, y esquizofrenia.

4. Hidrolizado para su uso según la reivindicación 2 o 3, donde la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Huntington.

5. Hidrolizado para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2, y opcionalmente uno, dos, tres o cuatro péptidos de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 6.

6. Hidrolizado para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el hidrolizado comprende además un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7.

7. Péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos selecciona del grupo formado por SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6.

8. Ácido nucleico que codifica un péptido según la reivindicación 7.

9. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 8.

10. Célula huésped que comprende el péptido según la reivindicación 7, el ácido nucleico según la reivindicación 8, y/o el vector según la reivindicación 9.

11. Hidrolizado de patas de pollo que comprende al menos un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos selecciona del grupo formado por SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 6.

12. Hidrolizado según la reivindicación 11 que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2, y opcionalmente uno, dos, tres o cuatro péptidos de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 6.

13. Hidrolizado según la reivindicación 11 o 12, que comprende además un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7.

14. Composición que comprende el péptido de la reivindicación 7, el ácido nucleico de la reivindicación 8, el vector de la reivindicación 9, la célula huésped de la reivindicación 10, y/o el hidrolizado de la reivindicación 11, 12 o 13, y uno o más vehículos, diluyentes, solventes o aditivos, preferentemente la composición es una composición nutracéutica, farmacéutica, o alimenticia.

15. Suplemento alimenticio, producto alimenticio o medicamento caracterizado porque comprende el péptido de la reivindicación 7, el ácido nucleico de la reivindicación 8, el vector de la reivindicación 9, la célula huésped de la reivindicación 10, el hidrolizado de la reivindicación 11, 12 o 13, y/o la composición de la reivindicación 14.

16. El péptido según la reivindicación 7, el ácido nucleico de la reivindicación 8, el vector de la reivindicación 9, la célula huésped de la reivindicación 10 o la composición según la reivindicación 14, para su uso en medicina.

17. El péptido según la reivindicación 7, el ácido nucleico de la reivindicación 8, el vector de la reivindicación 9, la célula huésped de la reivindicación 10 o la composición según la reivindicación 14, para su uso como adyuvante en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa.

18. El péptido según la reivindicación 7, el ácido nucleico de la reivindicación 8, el vector de la reivindicación 9, la célula huésped de la reivindicación 10 o la composición según la

reivindicación 14, para su uso en el tratamiento y/ prevención de una enfermedad neurodegenerativa.

19. El péptido, ácido nucleico, vector, célula huésped o composición para su uso según la reivindicación 17 o 18, donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo formado por enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parkinsonismo juvenil, enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, demencia frontotemporal, degeneración corticobasal, encefalopatía traumática crónica, ataxia espinocerebelosa tipo 3/enfermedad de Marchado-Joseph, y esquizofrenia.

20. El péptido, ácido nucleico, vector, célula huésped o composición para su uso según la reivindicación 17 o 18, donde la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Huntington.

21. Método para la obtención de un hidrolizado según la reivindicación 11, 12 o 13, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
a) Hidrólisis enzimática de una solución proteica de patas de pollo con una o más enzimas seleccionadas del grupo formado por proteasa, serinproteasa y aminopeptidasa, en condiciones adecuadas para la/s enzima/s;
b) Inactivación de la enzima.

22. Método según la reivindicación 21, donde la enzima es una combinación de una serinproteasa de *Bacillus licheniformis,* preferentemente E.C. 3.4.21.62, y una proteasa de *Bacillus amyloliquefaciens,* preferentemente E.C. 3.4.24.28, o es una serinproteasa de *Fusarium oxysporum*, preferentemente E.C. 3.4.21.4.

23. Uso del hidrolizado de la reivindicación 11, 12 o 13, para el consumo directo o como ingrediente en la industria alimentaria o de piensos.

FIG. 1A

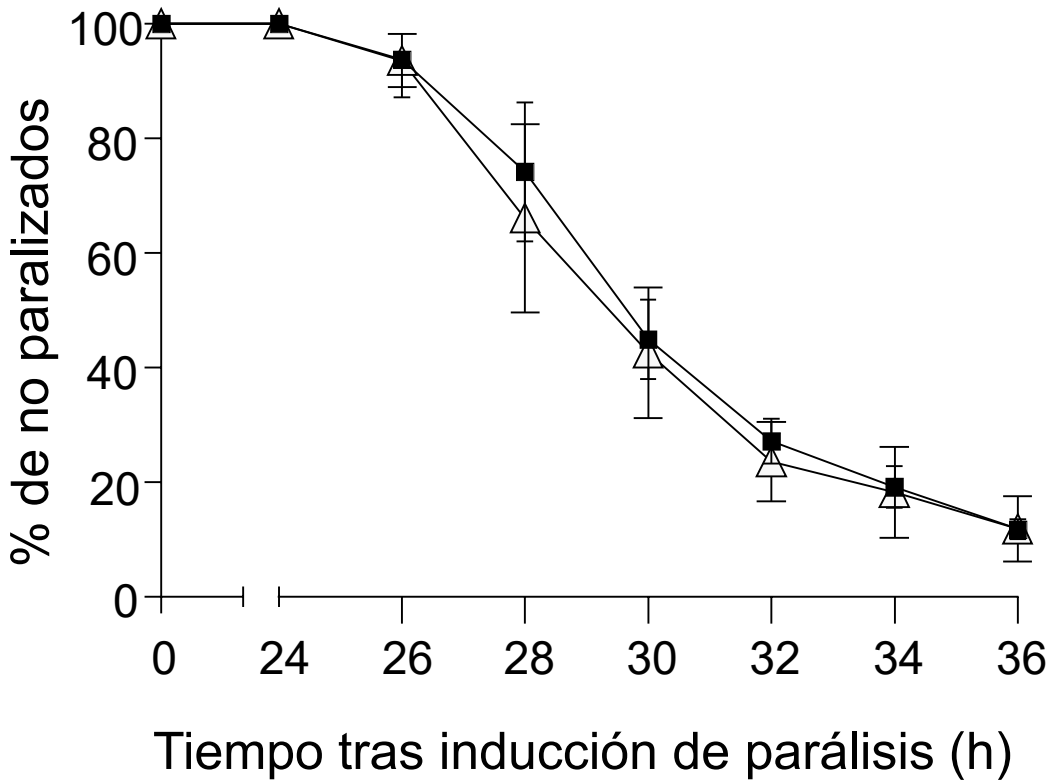
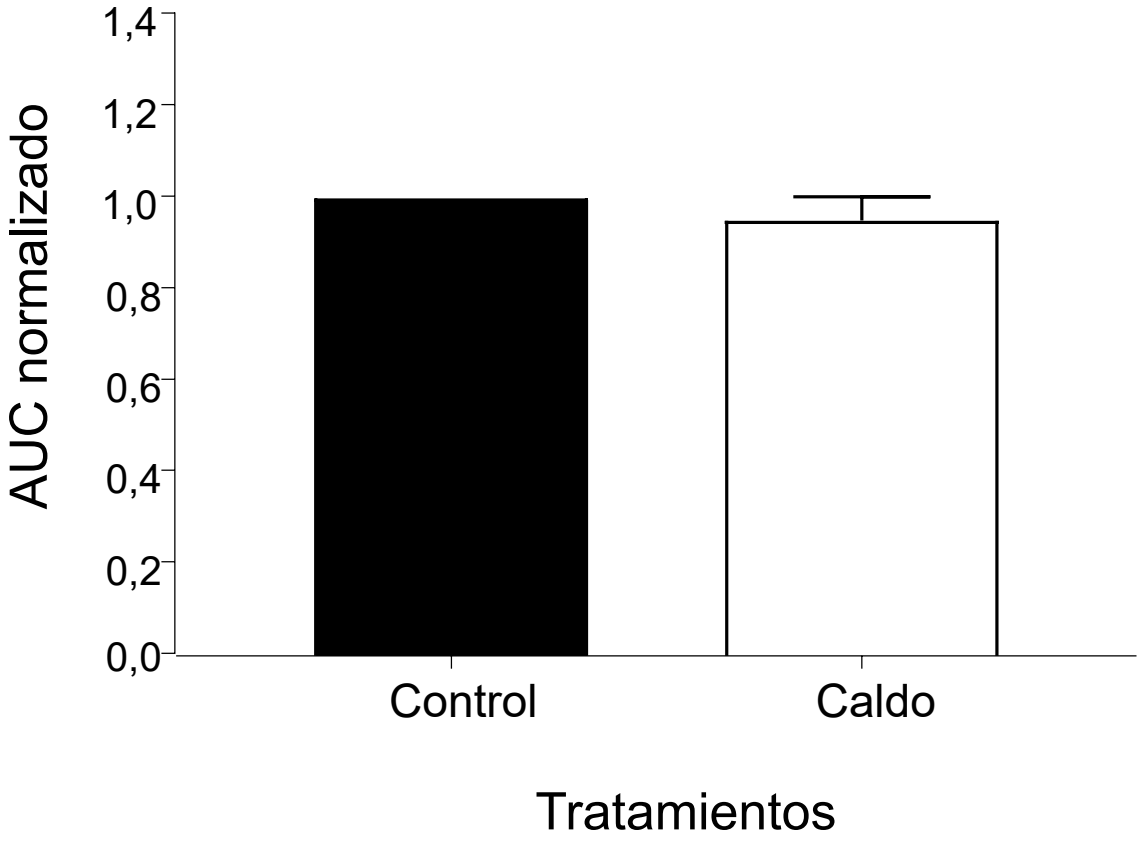

100
80
60
40
20
0
% de no paralizados
0
24
26
28
30
32
34
36
Tiempo tras inducción de parálisis (h)

FIG. 1B


AUC normalizado
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Control
Caldo
Tratamientos

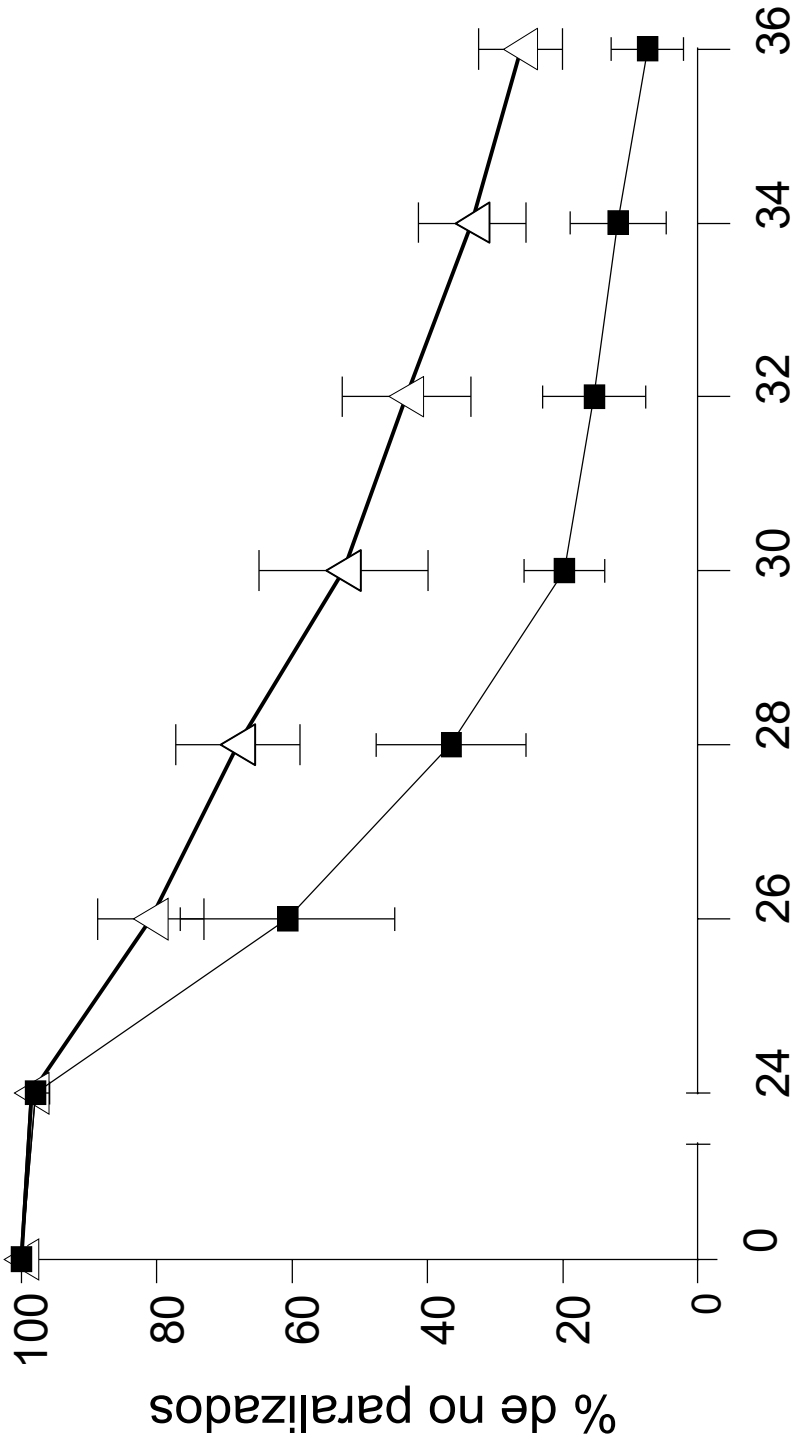

% de no paralizados
100
80
60
40
20
0
0
24
26
28
30
32
34
36
Tiempo tras inducción de parálisis (h)

FIG. 2A

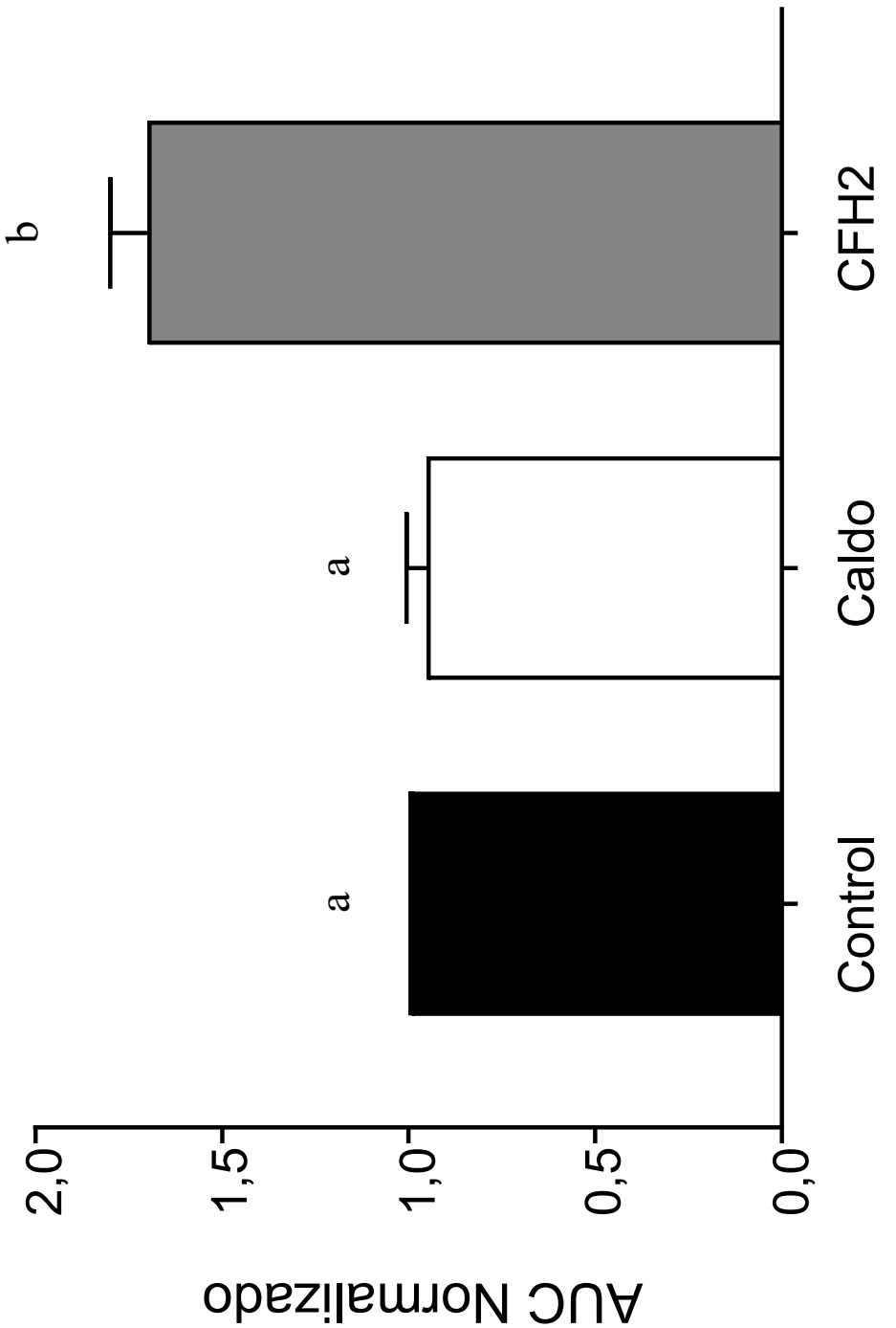


FIG. 2B

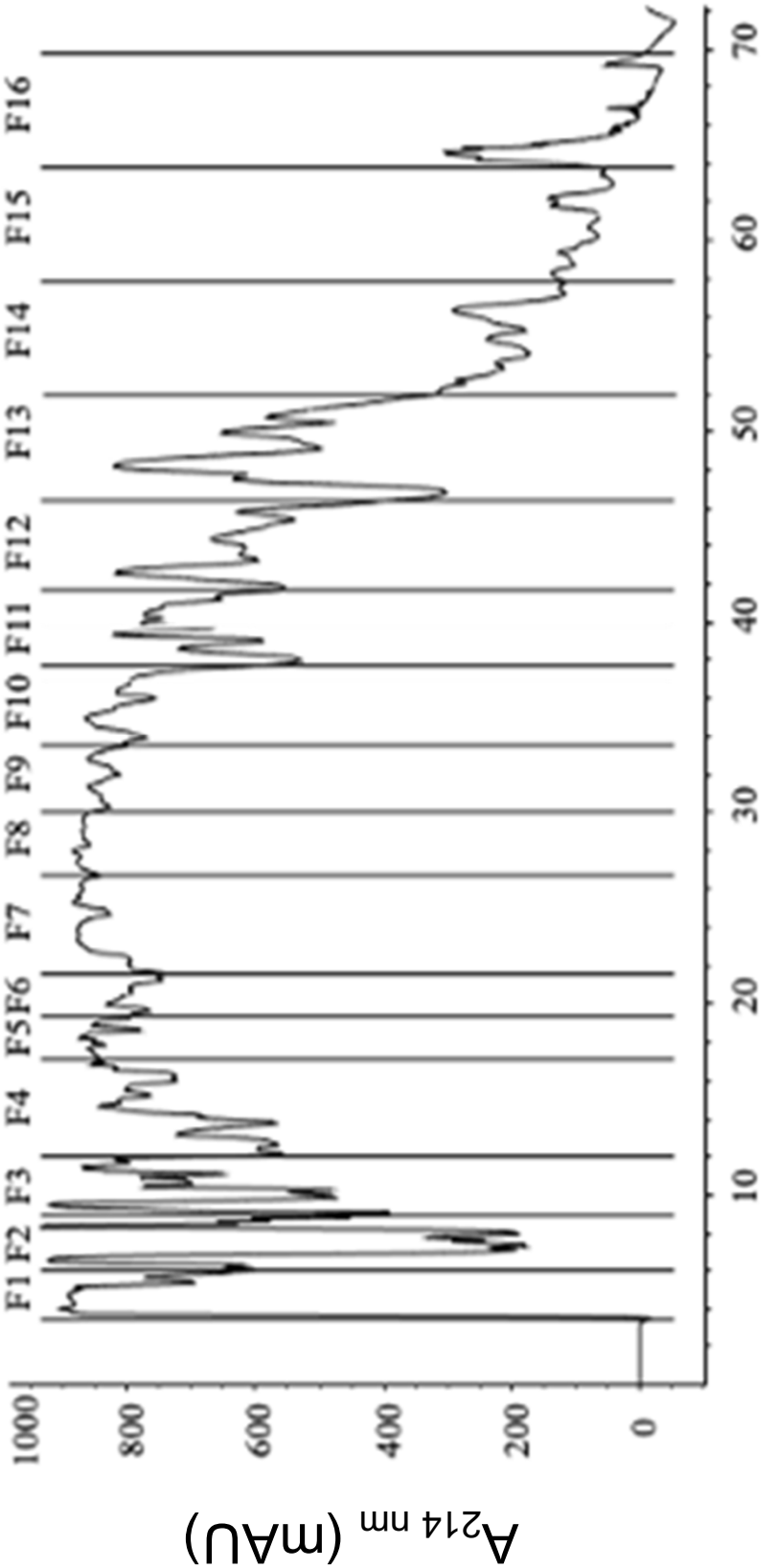

F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
F9
F10
F11
F12
F13
F14
F15
F16
1000
800
600
400
200
0
10
20
30
40
50
60
70
A214 nm (mAU)
Tiempo de retención (min)

FIG. 3A

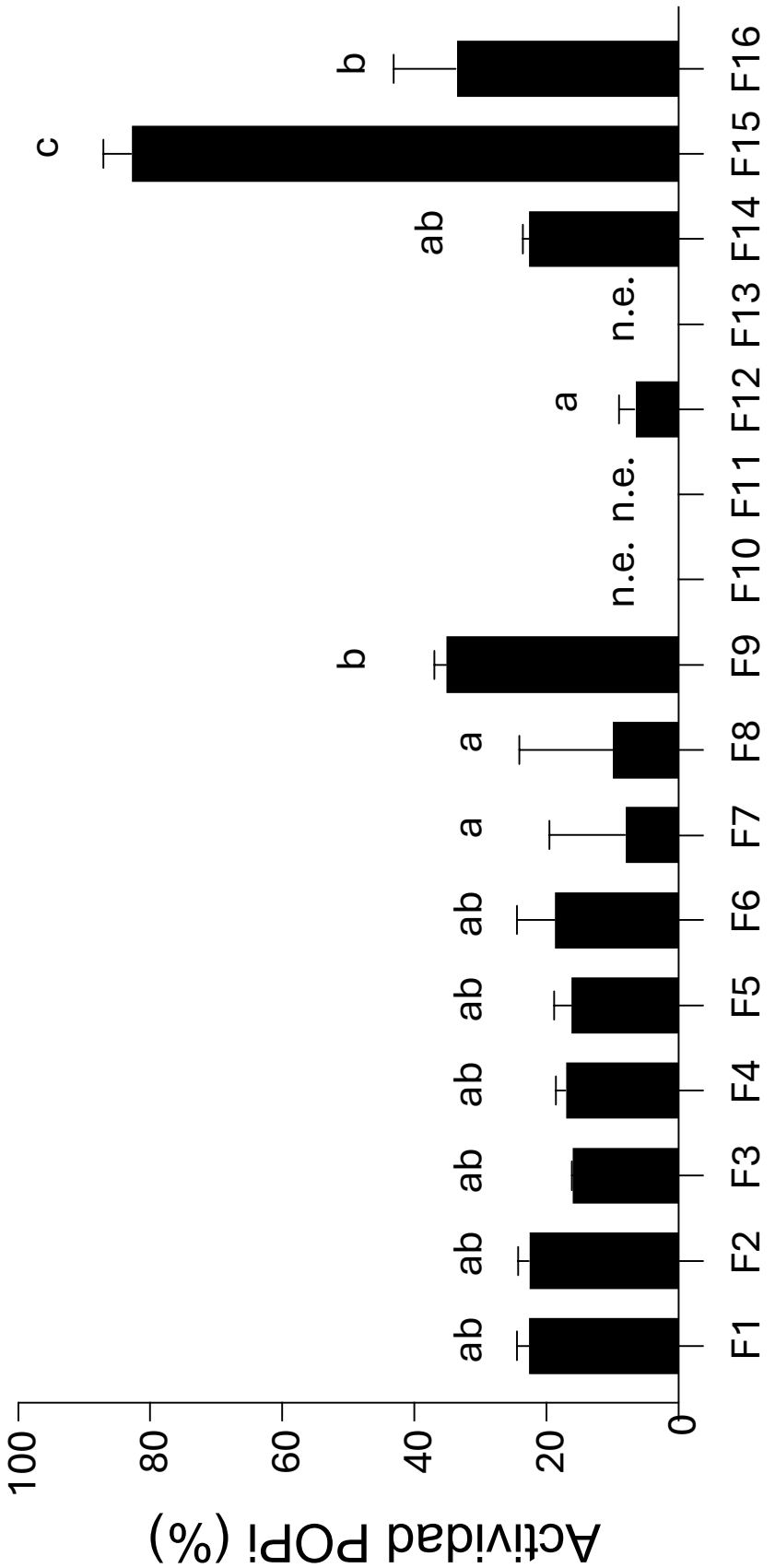

Actividad POPi (%)
0
20
40
60
80
100
F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
F9
F10
F11
F12
F13
F14
F15
F16
ab
ab
ab
ab
ab
ab
a
a
b
n.e.
n.e.
a
n.e.
ab
c
b
Fracción

FIG. 3B

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 202530235

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 19.03.2025

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

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

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
A	IBARZ-BLANCH, N. et al. Chicken slaughterhouse by-products: A source of protein hydrolysates to manage non-communicable diseases. Trends in Food Science & Technology, 2023, Vol. 139, artículo nº 104125, ISSN 0924-2244, <DOI: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104125>. páginas 1 - 4; páginas 17 - 19; tablas 1-6.	1-4, 7-10, 14-16, 18-22
A	ZABŁOCKA, A. et al. A Polypeptide complex isolated from chicken egg yolk with potential neuroprotective and antioxidative activity. Neuropsychiatry, 2018, Vol. 8, Nº 3, Páginas 833-842, <DOI: https://doi.org/10.3390/ijms242417494>. todo el documento.	1-4, 7-10, 14-16, 18-22
A	TSAI, S. F., et al. A hydrolyzed chicken extract CMI-168 enhances learning and memory in middle-aged mice. Nutrients, 2019, Vol. 11, Nº 1, artículo nº 27, <DOI: doi: 10.3390/nu11010027>. todo el documento.	1-4, 7-10, 14-16, 18-22
A	BARELLI, H. et al. S 17092-1, a highly potent, specific and cell permeant inhibitor of human proline endopeptidase. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, Vol. 257, Nº 3, Páginas 657-661, ISSN 0006-291X, <DOI: https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0366>. página 657, páginas 659-660.	1-4, 7-10, 14-16, 18-22
A	TOIDE, K. et al. JTP-4819: a novel prolyl endopeptidase inhibitor with potential as a cognitive enhancer. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1995, Vol. 274, Nº 3, Páginas 1370-1378, <DOI: https://doi.org/10.1016/S0022-3565(25)10670-8>. página 1370 páginas 1376 – 1377.	1-4, 7-10, 14-16, 18-22
A	BE 1027448 B1 (INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND TECH CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 08/02/2022, todo el documento	1-4, 7-10, 14-16, 18-22
A	CN 110136774 A (INST FOOD SCIENCE & TECH CAAS) 16/08/2019, todo el documento	1-4, 7-10, 14-16, 18-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☐ para todas las reivindicaciones

☒ para las reivindicaciones nº: 1-4, 7-10, 14-16, 18-22

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
18.02.2026	M. Cumbreño Galindo	1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K4/12 (2006.01)
C07K1/12 (2006.01)
A61K38/01 (2006.01)
A61P25/28 (2006.01)

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

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

AbS colección patentes, AbS colección literatura no patente, Internet, Invenes, Registry, EBI