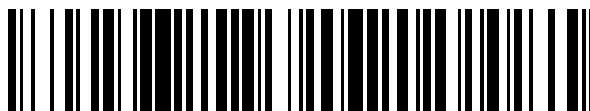


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 122**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**A23K 1/16** (2006.01)  
**A23L 1/305** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61P 19/08** (2006.01)  
**C07K 2/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08846202 .3**  
96 Fecha de presentación: **28.10.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2208735**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.07.2010**

54 Título: **ALIMENTO PARA ESTIMULAR LA DIFERENCIACIÓN DE OSTEÓBLASTOS E INHIBIR LA DIFERENCIACIÓN DE OSTEÓCLASTOS.**

30 Prioridad:  
**01.11.2007 JP 2007285394**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.12.2011**

73 Titular/es:  
**Megmilk Snow Brand Co., Ltd.**  
**1-1, Naebocho 6-chome**  
**Higashi-ku Sapporo-shi Hokkaido 0650043, JP**

72 Inventor/es:  
**SERIZAWA, Atsushi;**  
**MORITA, Yoshikazu;**  
**UETSUJI, Daisuke;**  
**ONO, Aiko;**  
**MATSUYAMA, Hiroaki y**  
**HIGURASHI, Satoshi**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 370 122 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Alimento para estimular la diferenciación de osteoblastos e inhibir la diferenciación de osteoclastos.

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a una fracción de proteína de leche o un producto de degradación de la fracción de proteína de leche que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibitor en la diferenciación de osteoclastos.

10 Debido a que la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de acuerdo con la presente invención muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibitor en la diferenciación de osteoclastos, la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche es útil como un agente estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibitor en la diferenciación de osteoclastos que ayuda a prevenir o tratar enfermedades óseas o a fortalecer un hueso, y también es útil como un ingrediente activo de un fármaco, comida y bebida, o alimento para prevenir o tratar enfermedades óseas o fortalecer un hueso, o estimular la diferenciación de osteoblastos e inhibir la diferenciación de osteoclastos.

**20 Técnica Anterior**

En años recientes, varias enfermedades óseas, tales como osteoporosis, fracturas óseas, lumbago o similares han aumentado junto con el progresivo aumento en la población anciana. En un tejido óseo, la osteogénesis y la reabsorción ósea ocurren incesantemente. En una persona joven, se mantiene un equilibrio entre osteogénesis y reabsorción ósea, pero el equilibrio se deteriora para la reabsorción ósea debido a varias causas del envejecimiento (desacoplamiento). La continuidad en este estado durante un largo periodo de tiempo hace que el tejido óseo sea frágil, dando como resultado la incidencia de varias enfermedades óseas, tales como osteoporosis, fracturas óseas, y lumbago. Se considera que la prevención del desacoplamiento permite la prevención de varias enfermedades óseas, tales como osteoporosis, fracturas óseas, y lumbago.

30 Convencionalmente, con el fin de prevenir el desacoplamiento para prevenir o tratar enfermedades óseas, se han realizado los siguientes métodos (1) suplemento de calcio mediante dieta, (2) ejercicio ligero, (3) exposición al sol, (4) medicación, y similares. Para el suplemento de calcio mediante dieta, se usan sales de calcio, tales como carbonato de calcio, fosfato de calcio o similares, o agentes naturales de calcio tales como cáscara de huevo, polvo de espina de pescado o similares. Sin embargo, estos materiales no son necesariamente adecuados para su ingesta oral. Hacer jogging o caminar, o similares pueden recomendarse como un ejercicio ligero. Sin embargo, incluso el ejercicio ligero es problemático para una persona cuyo cuerpo se ha debilitado, y para una persona mayor encamada es casi imposible hacer ejercicio. Se considera que la exposición al sol es un buen medio para suplementar la vitamina D<sub>3</sub> activada, pero no es suficiente por sí misma. 1 $\alpha$ -Hidroxivitamina D<sub>3</sub>, una preparación de calcitonina, o similares se usan para la administración de un fármaco, y es conocida por ser efectiva para tratar osteoporosis. Sin embargo, estas sustancias son farmacéuticas de por sí y no pueden usarse como un alimento.

45 Los inventores de la presente invención han buscado un factor fortalecedor óseo que esté contenido en la leche con el fin de obtener una sustancia fortalecedora ósea que pueda usarse como un alimento. Como resultado, los inventores descubrieron que una proteína y una mezcla de péptidos obtenida retirando una sal derivada de un suero de leche de una fracción soluble en agua de una proteína de suero de leche muestra un efecto fortalecedor óseo (véase Documento de Patente 1, por ejemplo). Los inventores descubrieron que una fracción obtenida sometiendo una solución acuosa de la proteína y la mezcla de péptidos a un tratamiento de etanol, un tratamiento de calor, un tratamiento con sal, y un tratamiento con membrana de ultrafiltración muestra un efecto estimulador del crecimiento de osteoblastos y un efecto fortalecedor óseo (véase Documentos de Patentes 2 y 3, por ejemplo). Los inventores descubrieron además que una proteína básica contenida en la leche muestra un efecto estimulador del crecimiento de osteoblastos, un efecto fortalecedor óseo y un efecto de prevención de reabsorción ósea (véase Documento de Patente 4, por ejemplo).

55 Documento de Patente 1: Patente Japonesa N° 3160862  
Documento de Patente 2: Patente Japonesa N° 3092874  
Documento de Patente 3: JP-A-H05-320066  
Documento de Patente 4: Patente Japonesa N° 3112637

**60 Divulgación de la invención****Problemas a resolver por la invención**

65 En base a los hallazgos de una fracción de proteína de leche o un producto de degradación de la fracción de proteína de leche que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibitor en la diferenciación de osteoclastos y que puede usarse como un alimento, un objeto de la presente invención es

proporcionar un agente estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos que contenga la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos, y un fármaco, comida, bebida, o alimento que contenga la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de fracción de proteína de leche que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos.

**Medios para resolver estos problemas**

Los inventores buscaron un material fortalecedor óseo nuevo, y descubrieron que podía obtenerse una fracción que mostraba un alto efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos en comparación con un alimento conocido. En base a esos hallazgos, los inventores obtuvieron de este modo un agente estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos que contenía la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos, y un fármaco, comida, bebida, o alimento que contiene la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos.

Específicamente, la presente invención está constituida de la siguiente manera:

(A) Una fracción de proteína de leche caracterizada porque

- (1) la fracción de proteína de leche está derivada de la leche,
- (2) la fracción de proteína de leche contiene proteínas que tienen un peso molecular de 75.000 a 80.000 daltons determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDP-PAGE),
- (3) la fracción de proteína de leche contiene de 13 a 15% por peso de aminoácidos básicos en la composición de aminoácido constituyente, y tiene un proporción aminoácido básico/aminoácido ácido de 0,5 a 0,7, y
- (4) la fracción de proteína de leche tiene un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos.

(B) Un producto de degradación de la fracción de proteína de leche obtenido mediante degradación de la fracción de proteína de leche anterior con una proteasa.

(C) Un agente estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos que comprende la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de acuerdo con (A) o (B), respectivamente.

(D) Un fármaco estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos que comprende la fracción de proteína de leche de acuerdo con (A) o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de acuerdo con (A) o (B), respectivamente.

(E) Una comida o bebida estimuladora en la diferenciación de osteoblastos e inhibidora en la diferenciación de osteoclastos que comprende la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de acuerdo con (A) o (B), respectivamente.

(F) Un alimento estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos que comprende la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de acuerdo con (A) o (B), respectivamente.

**Efectos de la invención**

El agente estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos que contiene la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos como un ingrediente activo, y el fármaco, comida, bebida, o alimento estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos que contiene la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de acuerdo con la presente invención que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos estimula la diferenciación de los osteoblastos e inhibe la diferenciación y crecimiento de osteoclastos en un cuerpo cuando se toma oralmente.

Por lo tanto, el agente que contiene la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos como un ingrediente activo, y el fármaco, comida, bebida, o alimento estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos que contiene la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos de acuerdo con la presente

invencción muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibitor en la diferenciación de osteoclastos estimulando la diferenciación de osteoblastos e inhibe la diferenciación de osteoclastos en el cuerpo vivo de un humano o un animal, y son efectivos para suprimir un descenso en la masa ósea debido a osteoporosis o similares.

5

#### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una vista que muestra un efecto inhibitor de diferenciación y maduración de osteoclastos de una fracción de proteína de leche (Ejemplo de prueba 2).

La Fig. 2 es una vista que muestra un efecto creciente la densidad ósea en ratones a los que se administró una fracción de proteína de leche (Ejemplo de prueba 3).

#### Mejor modo de realizar la invencción

La presente invencción se refiere a un agente estimulador en la diferenciación de osteoblastos que incluye una fracción de proteína de leche o un producto de degradación de la fracción de proteína de leche que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibitor en la diferenciación de osteoclastos, así como un fármaco, comida o bebida, y alimento que incluye una fracción de proteína de leche o un producto de degradación de la fracción de proteína de leche que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibitor en la diferenciación de osteoclastos.

20

La fracción de proteína de leche de acuerdo con la presente invencción puede obtenerse poniendo en contacto una materia prima de la leche, tal como leche desnatada, suero de leche o similares con una resina de intercambio catiónico, lavando la resina de intercambio catiónico con 0.2M de solución acuosa de cloruro de sodio, y eluyendo la proteína de leche adsorbida sobre la resina de intercambio catiónico usando un 0,35M eluyente de cloruro de sodio. Hay que señalar que puede usarse una sal tal como sal de potasio, una sal de amonio, un fosfato, un acetato, un carbonato o similares además del cloruro de sodio. La fracción de proteína de leche de acuerdo con la presente invencción puede obtenerse apropiadamente ajustando la fuerza iónica del agente de lavado de 0,15 a 0,25 y la fuerza iónica de la solución de elución de 0,3 a 0,4. Además, la fracción de proteína de leche de acuerdo con la presente invencción puede obtenerse recogiendo la fracción eluida, desalando y concentrando la fracción usando una membrana de ósmosis inversa (OI), electrodiálisis (ED), o similares, y opcionalmente secando el producto resultante. Ejemplos de membrana de ósmosis inversa (OI) incluyen Desal-3 (fabricada por Desalination), HR-95 (fabricada por Dow Danmark), NTR-729HF (fabricada por Nitto Denko Corporation), y similares. Ejemplos de un sistema de electrodiálisis (ED) incluyen sistemas de electrodiálisis fabricados por Yuasa-Ionics Inc. y Nippon Rensui Co., Ltd.

35

Se ha conocido como un método de obtención de una fracción de proteína traza derivada de la leche, un método de obtención de una fracción de proteína poniendo en contacto leche o una materia prima derivada de la leche con un intercambiador catiónico, y eluyendo la fracción de proteína básica que se adsorbe sobre el intercambiador catiónico usando un eluyente que tiene un pH superior a 5 y una fuerza iónica superior a 0,5 (JP-A-H05-202098), un método de obtención de una fracción de proteína usando un gel de ácido algínico (JP-A-S61-246198), un método de obtención de una fracción de proteína a partir de un suero de leche usando partículas inorgánicas porosas (JP-A-H01-86839), un método de obtención de una fracción de proteína usando un compuesto de éster sulfatado (JP-A-S63-255300), y similares. Las fracciones de proteína obtenidas mediante estos métodos pueden usarse en la presente invencción.

45

La fracción de proteína recogida de este modo puede normalmente pulverizarse mediante liofilización o similares antes de su uso.

La fracción de proteína de leche que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibitor en la diferenciación de osteoclastos usada en la presente invencción contiene preferentemente de 13 a 15% por peso de aminoácidos básicos en la composición de aminoácido constituyente, y tiene una proporción de aminoácido básico/aminoácido ácido de 0,5 a 0,7. El efecto de la presente invencción puede no conseguirse si el contenido de aminoácidos básicos o la proporción de aminoácido básico/aminoácido ácido está fuera de los intervalos citados. El producto de acuerdo con la presente invencción es una mezcla de proteínas que contiene proteínas que tienen un peso molecular de 75.000 a 80.000 daltons, y el punto isoeléctrico de las mismas es de 7,5 a 8,5 como un ingrediente principal.

55

El producto de degradación de la fracción de proteína de leche tiene la misma composición de aminoácido que la fracción de proteína de leche. Por ejemplo, un producto de degradación de la fracción de proteína de leche que tiene un peso molecular medio de 4.000 o menos puede obtenerse tratando una fracción de proteína de leche obtenida mediante el método anterior con una proteasa tal como pepsina, tripsina, quimotripsina o similares, y opcionalmente tratar el producto resultante con una proteasa tal como pancreatina o similares. El producto de degradación de la fracción de proteína de leche normalmente se pulveriza mediante liofilización o similares antes de su uso.

60

Como la leche o una materia prima de la leche que puede usarse como fuente de la fracción de proteína de la leche que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibitor en la diferenciación de

65

osteoclastos, puede darse leche de vaca, leche humana, leche de cabra, leche de oveja o similares. Tales leches pueden usarse como están, o pueden usarse leche recombinada, leche desnatada, suero, o similares derivados de tales leches.

5 La fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos y es un ingrediente activo puede usarse como tal cuando se administra el agente estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos de acuerdo con la presente invención. Hay que señalar que también es posible su uso después de haberlo formulado en un fármaco pulverizado, gránulos, un comprimido, una cápsula, una preparación bebible, o similares de acuerdo con un método convencional. Además, la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche, como está o después de formular una preparación de la misma, puede añadirse a una preparación nutriente, comida o bebida, o similares para conseguir un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos. Debido a que la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de acuerdo con la presente invención es relativamente estable frente al calor, la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche pueden esterilizarse con calor bajo condiciones convencionales.

20 En la presente invención, con el fin de conseguir un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos la dosis o similares pueden determinarse apropiadamente teniendo en cuenta el peso, el sexo, la edad y similares. La fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche pueden ajustarse a la cantidad de formulación de los mismos de manera que un adulto normal tome la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de la presente invención en una cantidad de 10 a 100 mg/día. Es decir, la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de la presente invención es efectiva a una dosis baja. En la presente invención, el ingrediente que tiene un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos ejerce el efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y el efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos cuando se administra oralmente un agente estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos o un fármaco, comida y bebida, o alimento que formula el agente estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos .

35 La presente invención se describe además más abajo a modo de ejemplos de referencia, ejemplos, y ejemplos de pruebas. Hay que señalar que los siguientes ejemplos ilustran meramente varios aspectos de la presente invención, y no deberían interpretarse como limitativos de la presente invención.

#### **Ejemplo de Referencia 1**

40 Una fracción de proteína que mostraba un efecto fortalecedor óseo que estaba disponible en el mercado se preparó de acuerdo con el siguiente método (véase Patente Japonesa N° 3112637).

45 Una columna (diámetro: 10 cm) cargada con 0,5 litros de Chitopearl sulfatada (resina de intercambio catiónico; fabricada por Fuji Spinning, Co., Ltd.) se lavó suficientemente con agua desionizada. Después de pasar 50 l de leche desnatada no esterilizada a través de la columna a una velocidad de flujo de 100 ml/min, la columna se lavó suficientemente con agua desionizada. Después se pasaron 2,5 l de 0,05M tampón de fosfato (pH 7,0) que contenía 0,95M de cloruro de sodio a través de la columna para eluir proteínas adsorbidas sobre la resina. El eluido se desaló y concentró por medio de un tratamiento con membrana de ósmosis inversa (OI), y después se liofilizó para obtener una fracción de proteína de leche en polvo. El procedimiento anterior se repitió dos veces para obtener 10<sup>4</sup> g de una fracción de proteína. La fracción de proteína tuvo un punto isoeléctrico de 7,0 a 8,5. El contenido de aminoácidos básicos en la fracción de proteína fue del 17,8%.

#### **Ejemplo 1**

55 Una columna (diámetro: 10 cm) cargada con 0,5 litros de Chitopearl sulfatada (resina de intercambio catiónico; fabricada por Fuji Spinning, Co., Ltd.) se lavó suficientemente con agua desionizada. Después de pasar 50 l de leche desnatada no esterilizada a través de la columna a una velocidad de flujo de 100 ml/min, la columna se lavó suficientemente con 0,05M tampón de fosfato (pH 7,0) que contenía 0,15M de cloruro de sodio. Después se pasaron 2,5 l de 0,05M tampón de fosfato (pH 7,0) que contenía 0,3M de cloruro de sodio a través de la columna para eluir proteínas adsorbidas sobre la resina. El eluido se desaló y concentró por medio de un tratamiento con membrana de ósmosis inversa (OI), y después se liofilizó para obtener una fracción de proteína de leche en polvo. El procedimiento anterior se repitió tres veces para obtener 55,4 g de una fracción de proteína. La fracción de proteína comprendió proteínas con un peso molecular de 75.000 a 80.000 daltons y el punto isoeléctrico de las mismas fue de 7,5 a 8,5. El contenido de aminoácidos básicos en el aminoácido constituyente contenido en la fracción de proteína fue del 13 a 15%. La fracción de proteína tuvo una proporción de aminoácido básico/aminoácido ácido de 0,5 a 0,7.

**Ejemplo 2**

Una columna (diámetro: 10 cm) cargada con 0,5 litros de Chitopearl sulfatada (resina de intercambio catiónico; fabricada por Fuji Spinning, Col, Ltd.) se lavó suficientemente con agua desionizada. Después de pasar 50 l de leche desnatada no esterilizada a través de la columna a una velocidad de flujo de 100 ml/min, la columna se lavó suficientemente con 0,05M tampón de fosfato (pH 7,0) que contenía 0,25M de cloruro de sodio. Después se pasaron 2,5 l de 0,05M tampón de fosfato (pH 7,0) que contenía 0,4M de cloruro de sodio a través de la columna para eluir proteínas adsorbidas sobre la resina. El eluido se desaló y concentró por medio de un tratamiento con membrana de ósmosis inversa (OI), y después se liofilizó para obtener la fracción de proteína de leche en polvo. El procedimiento anterior se repitió dos veces para obtener 37,3 g de una fracción de proteína. La fracción de proteína comprendió proteínas con un peso molecular de 75.000 a 80.000 daltons y un punto isoeléctrico de las mismas fue de 7,5 a 8,5. El contenido de aminoácidos básicos en el aminoácido constituyente contenido en la fracción de proteína fue del 13 al 15%. La fracción de proteína tuvo una proporción de aminoácido básico/aminoácido ácido de 0,5 a 0,7.

**Ejemplo 3**

55,4 g de la fracción de proteína de leche obtenida en el Ejemplo 1 se disolvieron en 10 l de agua destilada. Después de añadir pepsina (fabricada por Kanto Kagaku Co., Ltd) para tener una concentración del 2%, la fracción de proteína de leche se hidrolizó a 37 °C durante una hora con agitación. Después la mezcla se neutralizó a pH 6,8 con una solución de hidróxido de sodio, y 1% de pancreatina (fabricada por Sigma) se añadió a la misma. La mezcla después reaccionó a 37 °C durante dos horas. Después de la finalización de la reacción, la proteasa se inactivó calentando la mezcla a 80 °C durante 10 minutos para obtener 54,2 g de un producto de degradación de la fracción de proteína de leche.

**Ejemplo 4**

37,3 g de la fracción de proteína de leche obtenida en el Ejemplo 2 se disolvieron en 8 l de agua destilada. Después de añadir tripsina (fabricada por Kanto Kagaku Co., Ltd) para tener una concentración del 2%, la fracción de proteína de leche se hidrolizó a 37 °C durante una hora con agitación. Después la mezcla se neutralizó a pH 6,6 con una solución de hidróxido de sodio, y 1% de pancreatina (fabricada por Sigma) se añadió a la misma. La mezcla después reaccionó a 37 °C durante dos horas. Después de la finalización de la reacción, la proteasa se inactivó calentando la mezcla a 80 °C durante 10 minutos para obtener 36,7 g de un producto de degradación de la fracción de proteína de leche.

**Ejemplo de Prueba 1**

El efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos de la fracción de proteína de leche obtenida en el Ejemplo 1 (producto de Invención) y la fracción de proteína de leche en el Ejemplo de Referencia 1 (ejemplo de Referencia 1) se examinaron. Específicamente, células humanas de preosteoblasto MG63 se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad celular de  $2 \times 10^4$  células/pocillo, y se cultivaron a 37 °C durante cuatro días en un medio DMEM (fabricado por Flow Laboratories) que contenía un 10% de suero fetal bovino en presencia de un 5% de CO<sub>2</sub> para obtener las células cultivadas de la prueba. Después se sustituir el medio por un medio que contenía un 1% de suero fetal bovino, las fracciones de proteína de leche obtenidas en el Ejemplo 1 y el Ejemplo de Referencia 1 se añadieron al medio para que las concentraciones finales fueran de 10 a 100 µg/ml, y las células se cultivaron a 37 °C durante cinco días. El sobrenadante se recogió, y la cantidad de colágeno tipo I en el sobrenadante se midió usando un kit EIA de procolágeno tipo I péptido C (fabricado por Takara Bio Inc.) para determinar la actividad estimuladora en la diferenciación de osteoblastos. El "Control" es una muestra a la que no se añadió la proteína de leche. La cantidad de colágeno se indicó mediante la proporción (%) de la cantidad de colágeno tipo 1 en cada muestra con la cantidad de colágeno tipo I en el Control. Los resultados se muestran en la Tabla 1

Tabla 1

Muestra	Concentración Final	Actividad estimuladora en la diferenciación de osteoblastos
Control	--	100 ± 4,3 (± SD)
Fracción de proteína de leche (Ejemplo de Referencia 1)	100 µg/ml	157,2 ± 8,7
Fracción de proteína de leche (Ejemplo 1)	100 µg/ml	250,9 ± 12,7
Fracción de proteína de leche (Ejemplo 1)	10 µg/ml	180,3 ± 5,6

La cantidad de colágeno tipo I en cualquier muestra a la que se añadió la fracción de proteína de leche en el Ejemplo 1 o ejemplo de Referencia 1 aumentó en comparación con la del Control. Esto indica que la fracción de proteína de leche mostró un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos. La fracción de proteína obtenida en el Ejemplo 1 mostró una significativa habilidad en producción en masa en la producción de colágeno tipo I en comparación con la fracción de proteína de leche obtenida en el ejemplo de Referencia 1. Esto indica que la

fracción de proteína de leche obtenida en el Ejemplo 1 mostró un mayor efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos.

### Ejemplo de Prueba 2

5 Las células ST2 se sembraron en una placa de 96 pocillos para que la densidad celular fuera de  $2 \times 10^4$  células/pocillo, y se cultivaron en un 10% medio  $\alpha$ -MEM que contenía FBS (fabricado por GIBCO) en presencia de 5% de  $\text{CO}_2$  a 37 °C durante dos días. Las células de médula recogidas del fémur de un ratón ddy (macho, 7 u 8 semanas de edad) se sembraron en una capa de célula ST2, y se cultivaron a 37 °C durante 24 horas en presencia de un 5% de  $\text{CO}_2$ . Se sacó la solución de cultivo, y se añadió 1,0% de medio  $\alpha$ -MEM que contenía FBS que contenía  $1 \times 10^{-8}$  M  $1,25(\text{OH}_2)\text{D}_3$  y  $1 \times 10^{-7}$  M dexametasona a la placa (90  $\mu\text{l}$ /pocillo). Posteriormente, la fracción de proteína de leche obtenida en el Ejemplo 1 (Invención) o la fracción de proteína de leche obtenida en el ejemplo de Referencia 1 (Ejemplo de Referencia) se añadió a la placa (10  $\mu\text{l}$ /pocillo), y las células se cultivaron a 37 °C durante tres días en presencia de 5%  $\text{CO}_2$ . Después de sustituir el medio, las células se cultivaron además durante tres días. Después de la finalización del cultivo, la solución del cultivo se sacó, y el resultante se lavó con PBS, y después se trató con una solución acetona-etanol (1:1) durante un minuto y se fijó. Se añadieron 1,5 mg/ml disodio p-nitrofenilfosfato-20 mM tartrato de sodio-50 mM tampón de citrato (pH: 4,5) (10  $\mu\text{l}$ /pocillo), y la mezcla reaccionó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción terminó añadiendo 1M solución de hidróxido de sodio (50  $\mu\text{l}$ /pocillo). Después se midió la absorbancia a 405 nm, y se tomó como un índice de diferenciación y mutación de osteoclastos.

La Fig. 1 muestra los resultados de las pruebas de diferenciación y mutación de osteoclastos. Cuanto mayor es la absorbancia mayores son la diferenciación y mutación de osteoclastos.

25 Por lo tanto, se descubrió que la fracción de proteína de leche obtenida en el Ejemplo 1 (Invención) suprimió la diferenciación y mutación de osteoclastos en comparación con la fracción de proteína de leche (Control) obtenida en el ejemplo de Referencia 1 (ejemplo de Referencia). Específicamente, se confirmó que la fracción de proteína de leche de acuerdo con la presente invención suprime significativamente la diferenciación y mutación de osteoclastos en comparación con la proteína de leche obtenida en el ejemplo de Referencia 1.

### Ejemplo de Prueba 3

35 Las fracciones de proteína obtenidas en el ejemplo de Referencia 1 y Ejemplo 1 se investigaron sobre el efecto fortalecedor óseo de las mismas mediante experimentos con animales. Se usaron ratones hembra C57BL/6J (4 semanas de edad) para los experimentos animales. Después de una alimentación preliminar durante una semana, se extirpó el ovario de cada rata. Las ratas fueron alimentadas con comida deficiente en calcio durante cinco semanas y las ratas se proporcionaron para los experimentos animales. Los ratones a los que se les extirpó el ovario y que fueron alimentados con comida deficiente en calcio tuvieron osteoporosis. Los ratones que tuvieron osteoporosis se dividieron en tres grupos de prueba como un grupo de Control (Grupo A) al que no se le administró una fracción de proteína de leche, un grupo (Grupo B) al que se le administró 0,1% por peso de la fracción de proteína de leche obtenida en el ejemplo de Referencia 1, y un grupo (Grupo C) al que se le administró 0,1% por peso de la fracción de proteína de leche obtenida en el Ejemplo 1 (seis ratones/cada grupo). Cada grupo fue alimentado con la alimentación de prueba mostrada en la Tabla 2 durante cuatro meses. El contenido de nitrógeno en cada alimentación de prueba se ajustó igualmente a 17,06% usando caseína. Cada alimentación de prueba mezcló 300 mg de calcio, 230 mg de fósforo y 50 mg de magnesio por 100 g de la alimentación de la prueba.

Tabla 2

	Grupo		
	A	B	C
Caseína	20,0	19,9	19,9
Almidón de maíz	15,0	15,0	15,0
Celulosa	5,0	5,0	5,0
Aceite de maíz	5,0	5,0	5,0
Mezcla de vitaminas	1,0	1,0	1,0
Mezcla de minerales	2,65	2,65	2,65
Sacarosa	51,05	51,05	51,05
DL-Metionina	0,3	0,3	0,3
Fracción de proteína de leche obtenida en el ejemplo de Referencia 1	-	0,1	-
Fracción de proteína de leche obtenida en el Ejemplo 1	-	-	0,1

(% por peso)

50 Se extirpó el fémur de cada ratón que fue alimentado durante cuatro meses, y la densidad ósea se midió de acuerdo con el método de absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA) que usó un analizador de mineral óseo ("DCS-600" fabricado por Aloka Co., Ltd). La densidad del fémur del grupo de Control también se midió. Los resultados se muestran en la Fig. 2. Como se muestra en la Fig. 2, después de alimentarse con la alimentación de la prueba durante cuatro meses, las densidades del fémur de los ratones del grupo (Grupo B) a los que se les administró la

fracción de proteína de leche obtenida en el ejemplo de Referencia 1 y los del grupo (Grupo C) a los que se les administró la fracción de proteína de leche obtenida en el Ejemplo 1 fueron significativamente más altas que las de los ratones del grupo de Control. Cada fracción de proteína de leche mostró un efecto de incremento en la densidad ósea (es decir, efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y efecto inhibitor en la diferenciación de osteoclastos). Sin embargo, el efecto conseguido por la fracción de proteína de leche del producto de la presente invención fue más alto que el de la fracción de proteína de leche obtenida en el ejemplo de Referencia 1. Además, se observaron efectos similares en los casos que usaron los productos de degradación de las fracciones de proteína de leche obtenidos en los Ejemplos 3 y 4 (no mostrados en la Fig. 2).

10 **Ejemplo 5**

Se añadieron 100 mg de fracción de proteína de leche obtenida en el Ejemplo 1 con 93,4 g de glucosa cristalina hidratada, 5 g de carbonato de calcio, 1 g de éster de azúcar y 0,5 g de sabor, y la mezcla se mezcló. El resultante se formó después en un comprimido para obtener un agente estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibitor en la diferenciación de osteoclastos de acuerdo con la presente invención.

15 **Ejemplo 6**

Los componentes se mezclaron de acuerdo con la composición mostrada en la Tabla 3 para obtener una masa. La masa se formó y se coció al horno para producir una galleta para estimular la diferenciación de osteoblastos e inhibitor la diferenciación de osteoclastos.

Tabla 3

Harina	50,0 (%peso)
Azúcar	20,0
Sal	0,5
Margarina	12,5
Huevo	12,1
Agua	4,0
Hydrogenocarbonato de sodio	0,1
Bicarbonato de amonio	0,2
Carbonato de calcio	0,5
Polvo de la fracción de proteína de leche (Ejemplo 1)	0,1

25 **Ejemplo 7**

Se produjo una bebida de zumo de fruta para estimular la diferenciación de osteoblastos e inhibitor la diferenciación de osteoclastos que tiene una composición mostrada en la Tabla 4.

Tabla 4

Mezcla de azúcar isomerizado	15,0 (%peso)
Zumo de fruta	10,0
Ácido cítrico	0,5
Polvo de la fracción de proteína de leche (Ejemplo 1)	0,5
Sabor	0,1
Calcio	0,1
Agua	73,8

40 **Ejemplo 8**

Los ingredientes se mezclaron de acuerdo con la formulación mostrada en la Tabla 5 para producir una comida para perro para estimular la diferenciación de osteoblastos e inhibitor la diferenciación de osteoclastos.

Tabla 5

Polvo de la fracción de proteína de leche (Ejemplo 1)	2,5 (%peso)
Leche desnatada en polvo	13,5
Pastel de soja	12,0
Aceite de soja	4,0
Aceite de maíz	2,0
Aceite de palma	27,0
Almidón de maíz	14,0
Polvo de trigo	9,0
Salvado de trigo	2,0
Mezcla de vitaminas	9,0
Mezcla de minerales	2,0
Celulosa	3,0



**Ejemplo 9**

5 Cada ingrediente se mezcló de acuerdo con la formulación mostrada en la Tabla 6, y se formó bajo presión para producir un comprimido estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos que contenía el producto de degradación de la fracción de proteína de leche obtenido en el Ejemplo 3.

Tabla 6

Glucosa cristalina hidratada	59,4 (%peso)
Producto de degradación de la fracción de proteína de leche (Ejemplo 3)	16,0
Almidón de maíz	12,0
Celulosa	4,0
Aceite de maíz	4,0
Mezcla de vitaminas (incluyendo colina)	1,0
Mezcla de minerales	3,6

**Ejemplo 10**

10 Cada ingrediente se mezcló de acuerdo con la formulación mostrada en la Tabla 7, y se emulsionó a 85 °C para producir un queso procesado para estimular la diferenciación de osteoblastos e inhibir la diferenciación de osteoclastos que contenía el producto de degradación de la fracción de proteína de leche obtenido en el Ejemplo 4.

Tabla 7

Queso gouda	43,0 (%peso)
Queso cheddar	43,0
Citrato de sodio	2,0
Producto de degradación de la fracción de proteína de leche (Ejemplo 4)	0,5
Calcio derivado de leche	1,0
Agua	10,5

**Aplicabilidad Industrial**

20 La fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de acuerdo con la presente invención inhibe la diferenciación de osteoclastos, y por lo tanto muestra un efecto fortalecedor óseo. Además, ya que la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de acuerdo con la presente invención es efectivo para suprimir una disminución en la masa ósea, tal como osteoporosis, la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de acuerdo con la presente invención pueden usarse para un agente estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos que contiene la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche como un ingrediente activo, y un fármaco, comida, bebida o alimento que estimula la diferenciación de osteoblastos e inhibe la diferenciación de osteoclastos que contiene la fracción de proteína de leche o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche que muestra un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos.

30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una fracción de proteína de leche que tiene las siguientes características (1) a (4); (1) la fracción de proteína de leche está derivada de la leche, (2) la fracción de proteína de leche contiene proteínas que tienen un peso molecular de 75.000 a 80.000 daltons determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDP-PAGE), (3) la fracción de proteína de leche contiene de 13 a 15% por peso de aminoácidos básicos en la composición de aminoácido constituyente, y tiene una proporción aminoácido básico/aminoácido ácido de 0,5 a 0,7, y (4) la fracción de proteína de leche tiene un efecto estimulador en la diferenciación de osteoblastos y un efecto inhibidor en la diferenciación de osteoclastos.
- 10 2. Un producto de degradación de la fracción de proteína de leche obtenido mediante degradación de la fracción de proteína de leche de acuerdo con la reivindicación 1 con una proteasa.
- 15 3. Un agente estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos que comprende la fracción de proteína de leche de acuerdo con la reivindicación 1 o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de acuerdo con la reivindicación 2.
- 20 4. Un fármaco estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos que comprende la fracción de proteína de leche de acuerdo con la reivindicación 1 o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de acuerdo con la reivindicación 2.
- 25 5. Una comida o bebida estimuladora en la diferenciación de osteoblastos e inhibidora en la diferenciación de osteoclastos que comprende la fracción de proteína de leche de acuerdo con la reivindicación 1 o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de acuerdo con la reivindicación 2.
6. Un alimento estimulador en la diferenciación de osteoblastos e inhibidor en la diferenciación de osteoclastos que comprende la fracción de proteína de leche de acuerdo con la reivindicación 1 o el producto de degradación de la fracción de proteína de leche de acuerdo con la reivindicación 2.

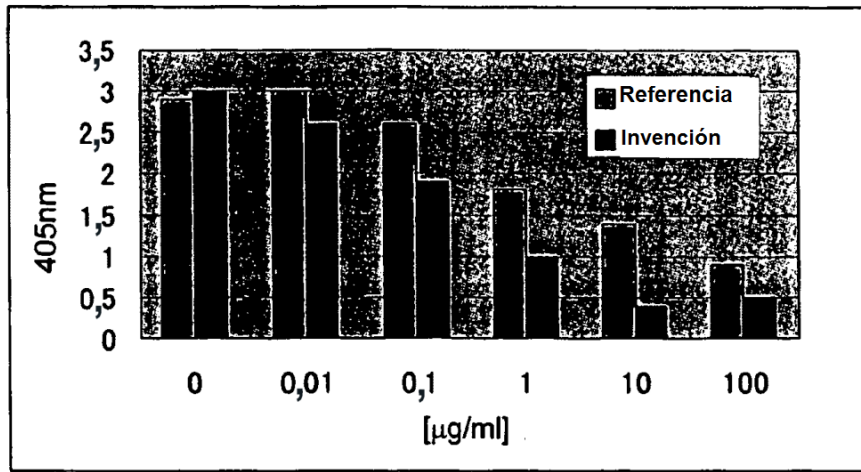


Fig. 1

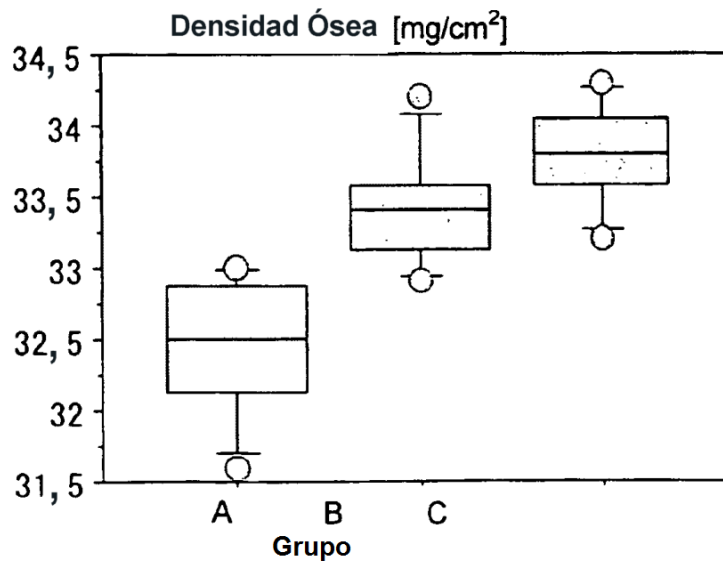


Fig. 2