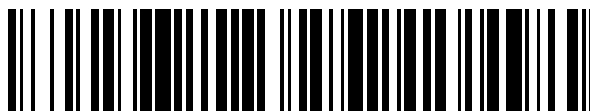


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 213**

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: **08844720 .6**
96 Fecha de presentación: **28.10.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2208734**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.07.2010**

54 Título: **Material de alimento para inhibir la formación de osteoclastos**

30 Prioridad:
01.11.2007 JP 2007285423

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.04.2012

73 Titular/es:
Megmilk Snow Brand Co., Ltd.
1-1, Naebocho 6-chome Higashi-ku
Sapporo-shi Hokkaido 065-0043, JP

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

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 378 213 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

Material de alimento para inhibir la formación de osteoclastos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una fracción de la proteína de la leche o a un producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche que exhibe un efecto inhibitor de la osteoclastogénesis.

- 10 Dado que la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche de acuerdo con la presente invención exhibe un efecto inhibitor de la osteoclastogénesis, la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche es útil como agente inhibitor de la osteoclastogénesis dirigido a la prevención o tratamiento de enfermedades óseas o refuerzo de un hueso, y también es útil como ingrediente activo de un producto farmacéutico, alimento, bebida o pienso dirigido a la prevención o
- 15 tratamiento de enfermedades óseas o inhibición de la osteoclastogénesis.

Técnica anterior

- 20 En los últimos años, varias enfermedades óseas, como la osteoporosis, fracturas óseas, lumbago o similares, han aumentado junto con el incremento progresivo en la población de ancianos. En un tejido óseo se producen de forma incesante osteogénesis y resorción ósea. En una persona joven se mantiene un equilibrio entre la osteogénesis y la resorción ósea, pero, con el envejecimiento, el equilibrio se altera hacia la resorción ósea debido a varias causas (desacoplamiento). Si este estado continúa durante un periodo de tiempo prolongado, el tejido óseo se convierte en frágil, lo que tiene como resultado la aparición de varias enfermedades óseas, como osteoporosis, fracturas óseas y
- 25 lumbago. Se considera que la prevención del desacoplamiento permite la prevención de varias enfermedades óseas, tales como osteoporosis, fracturas óseas y lumbago.

- Convencionalmente, con el fin de prevenir el desacoplamiento para prevenir o tratar enfermedades óseas se han realizado los procedimientos siguientes: (1) suplemento de calcio con la dieta, (2) ejercicio ligero, (3) insolación, (4)
- 30 medicación y similares. Para el suplemento de calcio con la dieta se usan sales de calcio, tales como carbonato cálcico, fosfato cálcico o similares, o agentes de calcio natural, tales como cáscara de huevo, polvo de hueso de pescado o similares. No obstante, estos materiales no necesariamente son adecuados para la ingesta oral. Hacer footing, caminar o similar puede estar recomendado como ejercicio ligero. No obstante, incluso el ejercicio ligero es molesto para una persona cuyo cuerpo se ha debilitado y es casi imposible para una persona anciana confinada en
- 35 cama realizar ejercicio. Se considera que la insolación es un buen medio para suplementar la vitamina D₃ activada, pero no es suficiente por sí sola. 1 α -Hidroxivitamina D₃, una preparación de calcitonina, o similar, se usa para administrar un agente farmacéutico y se sabe que es eficaz para tratar la osteoporosis. No obstante, estas sustancias son agentes farmacéuticos por sí mismas y no se pueden usar como material de alimentación.

- 40 Los inventores de la presente invención han buscado un factor de refuerzo óseo contenido en la leche con el fin de obtener una sustancia de refuerzo óseo que se pueda usar como material de alimento. Como resultado, los inventores han encontrado que una proteína y una mezcla peptídica obtenidos retirando una sal derivada del suero de la leche de una fracción soluble en agua de una proteína del suero de la leche exhiben un efecto de refuerzo óseo (véase, por ejemplo, el documento de patente 1). Los inventores han encontrado que una fracción obtenida
- 45 sometiendo una solución acuosa de la proteína y la mezcla peptídica a tratamiento con etanol, un tratamiento térmico, un tratamiento de salado y un tratamiento con membrana de ultrafiltración exhibe un efecto estimulador del crecimiento de osteoblastos y un efecto de refuerzo óseo (véase, por ejemplo, los documentos de patente 2 y 3). Los inventores también han encontrado que una proteína básica contenida en la leche exhibe un efecto estimulador del crecimiento de osteoblastos, un efecto de refuerzo óseo y un efecto de prevención de la resorción ósea (véase, por
- 50 ejemplo, el Documento de Patente 4).

Documento de patente 1: Patente japonesa N° 3160862

Documento de patente 2: Patente japonesa N° 3092874

Documento de patente 3: JP-A-H05-320066

- 55 Documento de patente 4: Patente japonesa N° 3112637

Divulgación de la invención

Problemas que ha de resolver la invención

- 60 Un objeto de la presente invención es proporcionar una fracción de la proteína de la leche o un producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche que exhibe un efecto inhibitor de la osteoclastogénesis y se puede usar como material de alimento, un agente inhibitor de la osteoclastogénesis que contiene la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche que exhibe un efecto
- 65 inhibitor de la osteoclastogénesis, y un agente farmacéutico, alimento, bebida o pienso para inhibir la osteoclastogénesis que contiene la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de

la proteína de la leche que exhibe un efecto inhibitor de la osteoclastogénesis.

Medios para resolver problemas

5 Los inventores han buscado un nuevo material inhibitor de la osteoclastogénesis y han encontrado que se podía obtener una fracción que exhibe un efecto alto inhibitor de la osteoclastogénesis en comparación con un material de alimento conocido. En base a dichos hallazgos, los inventores obtuvieron de este modo un agente inhibitor de la osteoclastogénesis que contenía la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche que exhibe un efecto inhibitor de la osteoclastogénesis y un agente farmacéutico, alimento, bebida o pienso que contiene la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche que exhibe un efecto inhibitor de la osteoclastogénesis.

Específicamente, la presente invención está constituida del siguiente modo:

15 (A) Una fracción de la proteína de la leche que tiene un efecto inhibitor de la osteoclastogénesis y las características siguientes;

- (1) la fracción de la proteína de la leche deriva de la leche,
- (2) la fracción de la proteína de la leche contiene proteínas que tienen un peso molecular de 80.000 a 85.000 dalton determinado mediante electroforesis en docecilsulfato sódico-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).
- (3) la fracción de la proteína de la leche contiene de 16 a 18 % en peso de aminoácidos básicos en la composición de aminoácidos constituyentes y tiene una proporción aminoácidos básicos/aminoácidos ácidos de 0,65 a 0,85, y
- (4) Una fracción de la proteína de la leche tiene un efecto inhibitor de la osteoclastogénesis.

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

(C) Un agente inhibitor de la osteoclastogénesis que comprende la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción proteínica de la leche de acuerdo con (A) o (B), respectivamente.

(D) Un agente farmacéutico para inhibir la osteoclastogénesis que comprende la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción proteínica de la leche de acuerdo con (A) o (B), respectivamente.

(E) Un alimento o bebida para inhibir la osteoclastogénesis que comprende la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche de acuerdo con (A) o (B), respectivamente.

(F) Un pienso para inhibir la osteoclastogénesis que comprende la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche de acuerdo con (A) o (B), respectivamente.

Efectos de la invención

El agente inhibitor de la osteoclastogénesis que contenía la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche que exhibe un efecto inhibitor de la osteoclastogénesis como ingrediente activo y el agente farmacéutico, alimento, bebida o pienso inhibitor de la osteoclastogénesis que contiene la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche que exhibe un efecto inhibitor de la osteoclastogénesis de acuerdo con la presente invención inhiben la osteoclastogénesis en un cuerpo cuando se toma por vía oral.

Por tanto, el agente inhibitor de la osteoclastogénesis que contenía la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche que exhibe un efecto inhibitor de la osteoclastogénesis como ingrediente activo y el agente farmacéutico, alimento, bebida o pienso inhibitor de la osteoclastogénesis que contiene la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche que exhibe un efecto inhibitor de la osteoclastogénesis de acuerdo con la presente invención exhiben un efecto de refuerzo óseo inhibiendo la osteoclastogénesis en el cuerpo de un ser humano o un animal y, por tanto, son eficaces en la supresión de una disminución de la masa ósea debido a la osteoporosis o similar.

Mejor modo para realizar la invención

La presente invención se refiere a un agente inhibitor de la osteoclastogénesis, incluida una fracción de la proteína de la leche o un producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche que exhibe un efecto inhibitor de la osteoclastogénesis como ingrediente activo, así como un agente farmacéutico, alimento, bebida o pienso inhibitor de la osteoclastogénesis que incluye una fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche que exhibe un efecto inhibitor de la osteoclastogénesis.

La fracción de la proteína de la leche de acuerdo con la presente invención se puede obtener, por ejemplo, poniendo en contacto una materia prima de la leche, tal como leche desnatada, suero de leche o similar, en contacto con una resina de intercambio catiónico, lavando la resina de intercambio catiónico con una solución de cloruro sódico 0,6M y eluyendo la proteína de la leche adsorbida sobre la resina de intercambio catiónico usando un eluyente de cloruro sódico de 1,0 a 1,5M. Obsérvese que sales, tales como una sal de potasio, una sal de amonio, un fosfato, un

acetato, un carbonato o similares, se pueden usar además de cloruro sódico. La fracción de la proteína de la leche de acuerdo con la presente invención se puede obtener ajustando adecuadamente la fuerza iónica del agente de lavado a 0,55 a 0,65 y la fuerza iónica de la solución de elución a 1,0 o más, preferentemente a 1,0 a 0,2- Además, la fracción de la proteína de la leche de acuerdo con la presente invención se puede obtener recogiendo la fracción eluida, desalando o concentrando la fracción usando una membrana de ósmosis inversa (OI), electrodiálisis (ED) o similar, y, opcionalmente, secando el producto resultante. Ejemplos de la membrana de ósmosis inversa (OI) incluyen Desal-3 (fabricado por Desalination), HR-95 (manufactured by Dow Denmark), NTR-729HF (fabricado por Nitto Denko Corporation), y similares. Ejemplos de un sistema de electrodiálisis (ED) incluyen sistemas de electrodiálisis, fabricado por Yuasa-Ionics Inc. y Nippon Rensui Co., Ltd.

Como procedimiento de obtener una fracción de proteína traza derivada de la leche se conocen un procedimiento de obtener una fracción de proteína poniendo en contacto la leche o una materia prima derivada de la leche con un intercambiador de cationes y eluyendo la fracción de proteína básica que se adsorbe sobre el intercambiador catiónico usando un eluyente que tiene un pH de más de 5 y una fuerza iónica de más de 0,5 (documento JP-A-H05-202098), un procedimiento de obtener una fracción de proteína usando un gel de ácido alginico (documento JP-A-S61 246198), un procedimiento de obtener una fracción de proteína de un suero de leche usando partículas inorgánicas porosas (documento JP-A-H01-86839), un procedimiento de obtener una fracción proteica de la leche usando un compuesto de éster sulfatado (documento JP-A-S63-255300) y similares. La fracción de proteína derivada de la leche se puede obtener mediante dichos procedimientos en la presente invención.

La fracción de proteína de la leche recogida de este modo normalmente puede convertirse en polvo liofilizando o similar antes de usar.

La fracción de la proteína de la leche que exhibe un efecto inhibidor de la osteoclastogénesis usado en la presente invención contiene, preferentemente, de 16 a 18 % en peso de aminoácidos básicos en la composición de aminoácidos constituyentes y tiene una proporción aminoácidos básicos/aminoácidos ácidos de 0,65 a 0,75. El efecto de la presente invención puede no alcanzarse si el contenido de los aminoácidos básicos o la proporción entre aminoácidos básicos/aminoácidos ácidos está fuera del intervalo anterior. El producto de la presente invención es una mezcla que contiene proteínas que tienen un peso molecular de 80.000 a 85.000 dalton y el punto isoeléctrico de 7 a 8 como componente principal.

El producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche tiene la misma composición de aminoácidos que la fracción de proteína de la leche. Por ejemplo, un producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche que tenga un peso molecular de 4.000 o menos se puede obtener tratando una fracción de la proteína de la leche obtenida mediante el procedimiento anterior con una proteasa tal como pepsina, tripsina, quimotripsina o similar, y, opcionalmente, tratando el producto resultante con una proteasa tal como pancreatina o similar. El producto de degradación de la fracción de proteína de la leche normalmente puede convertirse en polvo liofilizando o similar antes de usar.

Como leche o una materia prima derivada de la leche que se puede usar como fuente de la fracción de la proteína de la leche de acuerdo con la presente invención que exhibe un efecto inhibidor de la osteoclastogénesis se puede administrar leche de vaca, leche humana, leche de cabra, leche de oveja o similar. Estas leches se pueden usar como tal o se puede usar leche recombinada, leche desnatada, suero o similar derivado de dichas leches.

La fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la de la proteína de la leche que exhibe un efecto inhibidor de la osteoclastogénesis y es un ingrediente activo se puede usar como tal cuando se administra el agente inhibidor de la osteoclastogénesis de acuerdo con la presente invención. Obsérvese que también es posible usar después de formular en un agente farmacéutico en polvo, gránulos, un comprimido, una cápsula, una preparación bebible o similar de acuerdo con un procedimiento convencional. Además, la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la de la proteína de la leche, como tal o después de formular una preparación de la misma, se puede añadir a una preparación de nutriente, alimento y bebida, o similar para conseguir un efecto inhibidor de la osteoclastogénesis. Dado que la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la de la proteína de la leche de acuerdo con la presente invención es relativamente estable frente al calor, la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la de la proteína de la leche se puede esterilizar con calor en condiciones convencionales.

En la presente invención, con el fin de conseguir un efecto inhibidor de la osteoclastogénesis, se puede determinar adecuadamente la dosis o similar teniendo en cuenta el peso, el sexo, la edad y similar. Se puede ajustar la cantidad de formulación de la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la de la proteína de la leche de modo que un adulto normal tome la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche de la presente invención en una cantidad de 10 a 100 mg/día. Es decir, la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche de acuerdo con la presente invención es eficaz a una dosis baja. En la presente invención, el ingrediente que tiene un efecto inhibidor de la osteoclastogénesis ejerce el efecto inhibidor de la osteoclastogénesis cuando se administra por vía oral un agente inhibidor de la osteoclastogénesis o un producto farmacéutico, alimento y bebida o pienso formulados como agente inhibidor de la osteoclastogénesis.

La presente invención se describe adicionalmente más adelante a modo de ejemplos de referencia, ejemplos y ejemplos de prueba. Obsérvese que los ejemplos siguientes ilustran simplemente diversos aspectos de la invención, pero no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

5 Ejemplo de referencia 1

Una fracción de la proteína de la leche que exhibe un efecto inhibitor de la osteoclastogénesis que estaba disponible comercialmente se preparó de acuerdo con el procedimiento siguiente (véase la patente japonesa nº 3112637). Una columna (diámetro: 10 cm) cargada con 0,5 litros de Chitopearl sulfonado (resina intercambiadora de cationes; fabricada por Spinning Co., Ltd.) se lavó suficientemente con agua desionizada. Después de pasar 50 l de leche desnatada sin esterilizar a través de la columna a un caudal de 100 ml/min, la columna se lavó suficientemente con agua desionizada. 2,5 l de tampón fosfato 0,05M (pH 7,0) que contiene cloruro sódico 0,95, se pasaron después a través de la columna para eluir proteínas adsorbidas sobre la resina. El eluato se desaló y se concentró por medio de tratamiento con membrana de ósmosis inversa (OM) y después se liofilizó para obtener una fracción de proteína de leche en polvo. El procedimiento anterior se repitió dos veces para obtener 104 g de una fracción de proteína. La fracción de proteína tenía un punto isoeléctrico de 7,0 a 8,5. El contenido de aminoácidos básicos en la fracción de proteínas fue 17,8 %.

Ejemplo 1

Una columna (diámetro: 10 cm) cargada con 0,5 l de Chitopearl sulfonado (resina intercambiadora de cationes; fabricada por Spinning Co., Ltd.) se lavó suficientemente con agua desionizada. Después de pasar 50 l de leche desnatada sin esterilizar a través de la columna a un caudal de 100 ml/min, la columna se lavó suficientemente con tampón fosfato 0,05M (pH 7,0) que contiene cloruro sódico 0,55M. 2,5 l de tampón fosfato 0,05M (pH 7,0) que contiene cloruro sódico 1,45m, se pasaron después a través de la columna para eluir proteínas adsorbidas sobre la resina. El eluato se desaló y se concentró por medio de tratamiento con membrana de ósmosis inversa (OM) y después se liofilizó para obtener una fracción de proteína de leche en polvo. El procedimiento anterior se repitió dos veces para obtener 48 g de una fracción de proteína. La fracción de proteína tenía un peso molecular de 80.000 a 85.000 dalton y un punto isoeléctrico de 7,0 a 8,0. El contenido de aminoácidos básicos en los aminoácidos constituyentes contenidos en la fracción de proteínas fue de 16 a 18%. La fracción de proteína tenía una proporción entre aminoácidos básicos y aminoácidos ácidos de 0,65 a 0,85.

Ejemplo 2

Una columna (diámetro: 10 cm) cargada con 0,5 l de Chitopearl sulfonado (resina intercambiadora de cationes; fabricada por Spinning Co., Ltd.) se lavó suficientemente con agua desionizada. Después de pasar 50 l de leche desnatada sin esterilizar a través de la columna a un caudal de 100 ml/min, la columna se lavó suficientemente con tampón fosfato 0,05M (pH 7,0) que contiene cloruro sódico 0,55M. 2,5 l de tampón fosfato 0,05M (pH 7,0) que contiene cloruro sódico 1,0M, se pasaron después a través de la columna para eluir proteínas adsorbidas sobre la resina. El eluato se desaló y se concentró por medio de tratamiento con membrana de ósmosis inversa (OM) y después se liofilizó para obtener una fracción de proteína de leche en polvo. El procedimiento anterior se realizó una vez para obtener 22,1 g de una fracción de proteína de la leche. La fracción de proteína tenía un peso molecular de 80.000 a 85.000 dalton y un punto isoeléctrico de 7,0 a 8,0. El contenido de aminoácidos básicos en los aminoácidos constituyentes contenidos en la fracción de proteínas fue de 16 a 18%. La fracción de proteína tenía una proporción entre aminoácidos básicos y aminoácidos ácidos de 0,65 a 0,85.

Ejemplo 3

Una columna (diámetro: 10 cm) cargada con 0,5 l de Chitopearl sulfonado (resina intercambiadora de cationes; fabricada por Spinning Co., Ltd.) se lavó suficientemente con agua desionizada. Después de pasar 50 l de leche desnatada sin esterilizar a través de la columna a un caudal de 100 ml/min, la columna se lavó suficientemente con tampón fosfato 0,05M (pH 7,0) que contiene cloruro sódico 0,65M. 2,5 l de tampón fosfato 0,05M (pH 7,0) que contiene cloruro sódico 1,45m, se pasaron después a través de la columna para eluir proteínas adsorbidas sobre la resina. El eluato se desaló y se concentró por medio de tratamiento con membrana de ósmosis inversa (OM) y después se liofilizó para obtener una fracción de proteína de leche en polvo. El procedimiento anterior se repitió dos veces para obtener 48,8 g de una fracción de proteína de la leche. La fracción de proteína tenía un peso molecular de 80.000 a 85.000 dalton y un punto isoeléctrico de 7,0 a 8,0. El contenido de aminoácidos básicos en los aminoácidos constituyentes contenidos en la fracción de proteínas fue de 16 a 18%. La fracción de proteína tenía una proporción entre aminoácidos básicos y aminoácidos ácidos de 0,65 a 0,85.

Ejemplo 4

22,1 g de la fracción de la proteína de la leche obtenida en el Ejemplo 2 se disolvió en 8 l de agua destilada. Después de añadir tripsina (fabricada por Kanto Kagaku Co., Ltd.) para que la concentración del 2%, la fracción de la proteína de la leche se hidrolizó a 37 ° C durante una hora con agitación. Después de neutralizar la mezcla a pH 6,6 con una solución de hidróxido sódico, se añadió 1 % de pancreatinina (fabricada por Sigma). Después, la mezcla

se hizo de reaccionar a 37°C durante dos horas. Después de finalizada la reacción, la proteasa se inactivó calentando la mezcla a 80 °C durante 10 minutos para obtener 20,8 g de un producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche.

5 Ejemplo 5

48,8 g de la fracción de la proteína de la leche obtenida en el Ejemplo 3 se disolvió en 10 l de agua destilada. Después de añadir pepsina (fabricada por Kanto Kagaku Co., Ltd.) para que la concentración del 2%, la fracción de la proteína de la leche se hidrolizó a 37 ° C durante una hora con agitación. Después de neutralizar la mezcla a pH 6,8 con una solución de hidróxido sódico, se añadió 1 % de pancreatinina (fabricada por Sigma). Después, la mezcla se hizo de reaccionar a 37°C durante dos horas. Después de finalizada la reacción, la proteasa se inactivó calentando la mezcla a 80 °C durante 10 minutos para obtener 46,7 g de un producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche.

15 Ejemplo de ensayo 1

Un factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OPG) producido por un osteoblasto se conoce como inhibidor de la diferenciación de los osteoclastos fisiológicos. Como efecto inhibidor de la osteoclastogénesis se determinó el efecto de estimulación de la producción del OPG por los osteoblastos de cada una de las fracciones de la proteína de la leche obtenidas en el Ejemplo de Referencia 1 y en el Ejemplo 1. Específicamente, osteoblastos humanos MG63 se suspendieron en medio MEM-E (fabricado por GIBCO, suero bovino fetal: 10%, solución de aminoácidos no esenciales (fabricada por GIBCO): 1 %, solución de penicilina-estreptomina (fabricada por GIBCO): 1 %), de modo que la densidad fuera de 2×10^4 células/ml, y se añadieron a una placa de 96 pocillos (200 μ l/pocillo). Las células se cultivaron durante cuatro días en un incubador con dióxido de carbono al 5 %. Después de retirar el medio mediante succión, la fracción de la proteína de la leche obtenida en el medio MEM-E anterior (160 μ l/pocillo) y el medio MEM-E del Ejemplo 1 o del Ejemplo de Referencia 1 en el que la fracción de la proteína de la leche se disolvió hasta una concentración de 1,0 mg/ml o 0,1 mg/ml, respectivamente, se añadieron (40 μ l/pocillo), y las células se cultivaron adicionalmente durante cuatro días. Se recogió el sobrenadante del cultivo y se midió la concentración de OPG en el líquido sobrenadante del cultivo usando un kit de OPG-ELISA humano (fabricado por BIOMEDICA). Como control se usaron las células cultivadas solo en un medio MEM-M al que no se había añadido la muestra.

Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Muestra	Concentración final	Concentración de OPG (pmol/l)
Control	---	125 \pm 10,9 (% \pm OI)
Fracción de la proteína de la leche (Ejemplo de referencia 1)	1,0 mg/ml	162 \pm 13,1
Fracción de la proteína de la leche (Ejemplo 1)	1,0 mg/ml	368 \pm 24,7
Fracción de la proteína de la leche (Ejemplo 1)	0,1 mg/ml	182,9 \pm 15,6

Las fracciones de la proteína de la leche obtenidas en el Ejemplo de Referencia 1 y en el Ejemplo 1 estimularon la producción de OPG de los osteoblastos humanos MG63. El efecto de estimulación de la producción de OPG de la fracción de la proteína de la leche obtenida en el Ejemplo 1 fue significativamente mayor que la de la fracción de la proteína de la leche obtenida en el Ejemplo de Referencia 1. Esto indica que la fracción de la proteína de la leche obtenida en el ejemplo 1 exhibe un efecto inhibidor de la osteoclastogénesis excelente.

Ejemplo de ensayo 2

Mediante experimentos con animales se investigó cada efecto de refuerzo óseo de las fracciones de proteínas obtenidas en el Ejemplo de Referencia 1 y el Ejemplo 1. Para los experimentos con animales se usaron ratas Wistar (hembras, 4 semanas de edad). Después de una alimentación preliminar durante una semana se extrajeron los ovarios de cada rata. Después, se alimentó a las ratas con alimento sin calcio durante cinco semanas. Las ratas a las que se había extirpado los ovarios y que recibieron alimentación deficiente en calcio durante cinco semanas presentaban síntomas de osteoporosis obvios. Las ratas que tenían síntomas de osteoporosis se dividieron en 3 grupos de experimentos (siete ratas por cada grupo) de un grupo control (Grupo A) al que no se administró la fracción de la proteína de la leche, un grupo (Grupo B) al que se administró 0,1 % en peso de la fracción de la proteína de la leche obtenida en el Ejemplo de Referencia 1 y un grupo (Grupo C) al que se administró 0,1 % en peso de la fracción de la proteína de la leche obtenida en el Ejemplo 2. A cada grupo se administró un pienso de ensayo que se muestra en la Tabla 2, durante cuatro meses. El contenido en nitrógeno de cada pienso de ensayo se ajustó de forma uniforme hasta 17,06 % usando caseína. Cada pienso de ensayo se mezcló con 300 mg de calcio, 230 mg de fósforo y 50 mg de magnesio por 100 g del pienso de ensayo.

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	10,	1,0	1,0
Mezcla mineral	2,65	2,65	2,65
Sacarosa	51,05	51,05	51,05
OL-metionina	0,3	0,3	0,3
Fracción de la proteína de la leche obtenida en el ejemplo de referencia 1		0,1	
Fracción de la proteína de la leche obtenida en el ejemplo 1			0,1

(% en peso)

- 5 De cada rata alimentada durante cuatro meses se extrajo el fémur y se midió el contenido mineral óseo mediante absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA) usando un analizador mineral óseo ("DCS-600" fabricado por Aloka). También se midió el contenido mineral del fémur del grupo control. Los resultados se muestran en la Tabla 3.
- 10 Como se muestra en la Tabla 3, el contenido mineral del fémur de las ratas del grupo (Grupo B) al que se administró la fracción de la proteína de la leche obtenida en el Ejemplo de Referencia 1 y del grupo (Grupo C) al que se administró la fracción de la proteína de la leche obtenida en el Ejemplo 2 fue significativamente mayor que el de las ratas del grupo control después de alimentarlas con el pienso de ensayo durante cuatro meses. Se admitió que cada fracción de la proteína de la leche exhibía un efecto de incremento del contenido mineral óseo, es decir un efecto inhibidor de la osteoclastogénesis. No obstante, el efecto alcanzado por el producto de la presente invención
- 15 fue mayor que en de la fracción de la proteína de la leche obtenida en el Ejemplo de Referencia 1. Se observó un efecto similar al usar los productos de degradación de la fracción de la proteína de la leche obtenidas en los Ejemplos 4 y 5 (pero no se muestran los resultados).

Tabla 3

	Contenido mineral óseo (mg \pm SD)
Control (Grupo A)	129,4 \pm 4,2
Fracción de proteína de la leche obtenida en el Ejemplo de Referencia 1 (Grupo B)	135,2 \pm 3,4
Fracción de proteína de la leche obtenida en el Ejemplo 2 (Grupo C)	140,0 \pm 2,5

Ejemplo 6

- 25 100 mg de la fracción de la proteína de la leche obtenida en el Ejemplo 1 se añadieron con 93,4 g de glucosa cristalina hidrato, 5 g de carbonato cálcico, 1 g de un éster de azúcar y 0,5 g de sabor, y se mezclaron. Después, el resultante se formó en un comprimido para obtener un agente inhibidor de la osteoclastogénesis de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo 7

- 30 Los componentes siguientes se mezclan de acuerdo con la composición que se muestra en la Tabla 4 para obtener una pasta. La pasta se formó y se coció para producir una galleta para inhibir la osteoclastogénesis.

Tabla 4

Harina	50,0 (% en peso)
Azúcar	20,0
Sal	0,5
Margarina	12,5
Huevo	12,1
Agua	4,0
Hidrógenocarbonato sódico	0,1
Bicarbonato amónico	0,2
Carbonato cálcico	0,5
Polvo de la fracción de la proteína de la leche (Ejemplo 1)	0,1

Ejemplo 8

5 Se produjo una bebida de zumo de frutas inhibidor de la osteoclastogénesis que tiene una composición que se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

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

Ejemplo 9

15 Los ingredientes se mezclaron de acuerdo con la formulación que se muestra en la Tabla 6 para producir un pienso para perros para inhibir la osteoclastogénesis.

Tabla 6

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

Ejemplo 10

20 Cada ingrediente se mezcló de acuerdo con la formulación mostrada en la Tabla 7 y se formó a presión para

producir un comprimido inhibidor de la osteoclastogénesis que contiene el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche obtenida en el Ejemplo 4.

Tabla 7

5	Glucosa cristalina hidrato	59,4 (% en peso)
	Producto de la degradación de la fracción de la proteína de la leche (Ejemplo 4)	16,0
	Almidón de maíz	12,0
	Celulosa	4,0
	Aceite de maíz	4,0
	Mezcla de vitaminas (incluida colina)	1,0
	Mezcla de minerales	3,60

Ejemplo 11

10 Cada ingrediente se mezcló de acuerdo con la formulación mostrada en la Tabla 8 y se emulsionó a 85 °C para producir un queso procesado inhibidor de la osteoclastogénesis de formulación del producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche obtenido en el Ejemplo 5.

Tabla 8

	Queso de Gouda	43,0 (% en peso)
	Queso Cheddar	43,0
	Citrato sódico	2,0
	Producto degradación de la proteína de la leche (Ejemplo 5)	0,5
	Calcio derivado de leche	1,0
	Agua	10,5

15

Aplicabilidad industrial

20 La fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la de la proteína de la leche de acuerdo con la presente invención exhibe un efecto inhibidor de la osteoclastogénesis y es eficaz para suprimir una disminución de masa ósea observada en la osteoporosis. Por tanto, la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche se puede usar para un agente inhibidor de la osteoclastogénesis que contiene la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche que exhibe un efecto inhibidor de la osteoclastogénesis como ingrediente activo y un agente farmacéutico, alimento, bebida o pienso inhibidor de la osteoclastogénesis que contiene la fracción de la proteína de la leche o el producto de degradación de la fracción de la proteína de la leche que exhibe un efecto

25 inhibidor de la osteoclastogénesis.

REIVINDICACIONES

1. Una fracción de la proteína de la leche que tiene las características siguientes (1) a (4);

- 5 (1) la fracción de la proteína de la leche deriva de la leche,
(2) la fracción de la proteína de la leche contiene proteínas que tienen un peso molecular de 80.000 a 85.000 dalton determinado mediante electroforesis en docecilsulfato sódico-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).
10 (3) la fracción de la proteína de la leche contiene de 16 a 18 % en peso de aminoácidos básicos en la composición de aminoácidos constituyentes y tiene una proporción aminoácidos básicos/aminoácidos ácidos de 0,65 a 0,85, y
(4) la fracción de la proteína de la leche tiene un efecto inhibidor de la osteoclastogénesis.

2. Un producto de degradación de la fracción proteína de la leche obtenido mediante degradación de la fracción de la proteína de la leche de acuerdo con la reivindicación 1 con una proteasa.

15 3. Un agente inhibidor de la osteoclastogénesis que comprende la fracción de la proteína de la leche de acuerdo con la reivindicación 1 o el producto de degradación de la fracción proteína de la leche de acuerdo con la reivindicación 2.

20 4. Un agente farmacéutico para usar en la inhibición de la osteoclastogénesis que comprende la fracción de la proteína de la leche de acuerdo con la reivindicación 1 o el producto de degradación de la fracción proteína de la leche de acuerdo con la reivindicación 2.

25 5. Un alimento o bebida para usar en la inhibición de la osteoclastogénesis que comprende la fracción de la proteína de la leche de acuerdo con la reivindicación 1 o el producto de degradación de la fracción proteína de la leche de acuerdo con la reivindicación 2.

30 6. Un pienso para usar en la inhibición de la osteoclastogénesis que comprende la fracción de la proteína de la leche de acuerdo con la reivindicación 1 o el producto de degradación de la fracción proteína de la leche de acuerdo con la reivindicación 2.