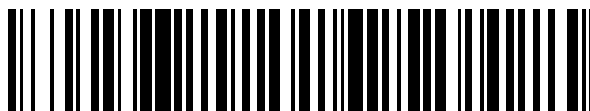


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 294**

51 Int. Cl.:

**C08H 1/06** (2006.01)

**C08L 89/06** (2006.01)

**C12P 21/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2006 E 06761950 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 1885771**

54 Título: **Procedimiento de fabricación de un hidrolizado de gelatina de bajo peso molecular y composiciones de hidrolizado de gelatina**

30 Prioridad:

**31.05.2005 US 140863**

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

**31.03.2014**

73 Titular/es:

**GELITA AG (100.0%)  
UFERSTRASSE 7  
69412 EBERBACH, DE**

72 Inventor/es:

**BABEL, WILFRIED;  
DOLPHIN, JOHN M.;  
KEENAN, TOM y  
RUSSELL, JASON D.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 452 294 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

Procedimiento de fabricación de un hidrolizado de gelatina de bajo peso molecular y composiciones de hidrolizado de gelatina

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere en general a un hidrolizado de gelatina, a un procedimiento de preparación del hidrolizado de gelatina y a una composición que comprende el hidrolizado de gelatina. Más específicamente, la presente invención proporciona un hidrolizado de gelatina de bajo peso molecular que tiene un alto contenido de amina primaria, a un procedimiento de preparación del hidrolizado de gelatina y a una composición de gelatina que comprende hidrolizado de gelatina.

**10 Antecedentes de la invención**

La gelatina se fabrica mediante la desnaturalización del colágeno contenido en materiales tales como piel de cerdo, piel de ganado vacuno y huesos de animales. Al igual que su proteína parental, el colágeno, la gelatina se define por una estructura distintiva que comprende una mezcla única de aminoácidos. El colágeno nativo es una escleroproteína basada en una cadena polipeptídica que comprende aproximadamente 1.050 aminoácidos. Tres de estas cadenas polipeptídicas se unen para formar una triple hélice. La superposición de varias de estas hélices triples produce fibrillas de colágeno que se estabilizan mediante reticulación, formando de esta manera una estructura de red tridimensional. Esta estructura particular convierte el colágeno en insoluble; a continuación, se convierte a una forma soluble mediante hidrólisis parcial como gelatina o hidrolizado de gelatina. El contenido de aminoácidos del colágeno y por lo tanto de la gelatina, es de aproximadamente un tercio de glicina y un 22% adicional de prolina y 4-hidroxiprolina; el 45% restante comprende 17 aminoácidos diferentes. La gelatina tiene un contenido particularmente alto de aminoácidos ácidos y básicos. De entre los aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), hay presentes cantidades variables en la forma amido como glutamina y asparagina en función de las condiciones de procesamiento usadas en el procedimiento de fabricación de gelatina. La cisteína está completamente ausente; de entre los aminoácidos que contienen azufre, la metionina es el único presente.

25 Los datos para el colágeno de las aves de corral y el pescado son algo diferentes, pero la presente invención es aplicable, de manera similar, a la gelatina y/o el hidrolizado de gelatina derivados del colágeno de aves de corral y pescado.

La gelatina puede ser usada en una amplia gama de aplicaciones, dependiendo de su material de partida y el procedimiento de fabricación. Esto es debido a que el comportamiento físico y químico de la gelatina viene determinado por un lado por una combinación de su contenido de aminoácidos y la estructura espacial resultante y, por otro lado, por una gran variedad de condiciones tales como el pH, la fuerza iónica y las reacciones con otras moléculas. Por ejemplo, se utilizan diferentes tipos de gelatinas en diversas aplicaciones, tales como alimenticias, fotográficas, cosméticas y farmacéuticas.

35 En la industria farmacéutica, la gelatina se usa, entre otras cosas, en la fabricación de cápsulas duras y blandas. Las cápsulas de gelatina proporcionan un procedimiento conveniente y eficaz para administrar por vía oral un fármaco, debido a que las cápsulas se desintegran rápidamente tras la exposición al contenido ácido del estómago, liberando de esta manera el fármaco en el cuerpo. Aunque las cápsulas de gelatina proporcionan una manera farmacéuticamente elegante de administración de un fármaco, sin embargo, existe un riesgo de que la cápsula de gelatina pueda sufrir un retardo en la desintegración y la disolución como resultado de un procedimiento conocido como reticulación. Se cree que la reticulación ocurre cuando los grupos carbonilo en la gelatina, los ingredientes de relleno que contienen carbonilo en cápsulas, o la descomposición de los ingredientes de relleno en compuestos de carbonilo, reaccionan con aminas primarias y otros compuestos nitrogenados presentes en la gelatina para formar enlaces cruzados.

45 La reticulación, en particular, puede tener graves consecuencias en el rendimiento de las cápsulas de gelatina después de un almacenamiento prolongado y exposición a condiciones extremas de calor y humedad. Una reticulación extensa de la gelatina en las formulaciones de cápsula puede conducir a la formación de una película muy fina, resistente y no soluble en agua, normalmente denominada película. La película actúa como una capa de goma, no soluble en agua, que puede restringir o prevenir la liberación de los contenidos de la cápsula.

Un medio para prevenir la reticulación cruzada en las cápsulas de gelatina, sobre el que se ha informado ampliamente, se centra en productos que actúan como eliminadores de carbonilo, previniendo la interacción de los grupos carbonilo, por ejemplo, grupos aldehído, con la cubierta de la cápsula de gelatina, previniendo de esta manera la reticulación de la gelatina. Generalmente, todos estos procedimientos sugieren la adición de productos a la composición farmacéutica contenida en las cápsulas de gelatina. Por ejemplo, se ha demostrado que la adición del aminoácido glicina y ácido cítrico en combinación a las formulaciones encapsuladas en cápsulas de gelatina dura mejoró el perfil de disolución de las cápsulas duras (3). Se demostró que la adición del aminoácido glicina solo no proporcionó resultados satisfactorios.

Pero la adición de eliminadores de carbonilo, tales como glicina, y ácidos carboxílicos, tales como citrato, en las cantidades necesarias para reducir la reticulación en las cápsulas de gelatina tiene un costo que es significativamente prohibitivo. Así, la adición de estos productos a la gelatina no es una solución práctica para reducir la reticulación en las cápsulas de gelatina.

- 5 El documento US 6.465.209 B1 describe procedimientos de producción de hidrolizados de proteínas, que comprenden añadir a un material proteínico una o más aminopeptidasas que tienen propiedades de liberación de glicina y una o más proteasas adicionales en las que la cantidad de glicina producida es mayor que la cantidad de glicina producida por las una o más proteasas adicionales solas bajo las mismas condiciones.

### Resumen de la invención

- 10 La presente invención proporciona un medio práctico y rentable para reducir la reticulación en la gelatina. Brevemente, la invención abarca un hidrolizado de gelatina de bajo peso molecular que, cuando se mezcla con la gelatina de alto peso molecular, reduce la reticulación y mejora las propiedades de disolución de la gelatina mediante el aumento de las cantidades de glicina libre, otros aminoácidos y pequeños péptidos en el producto de gelatina mezclada. De manera ventajosa, debido a que el hidrolizado de gelatina y la composición de gelatina mezclada de la invención han reducido las propiedades de reticulación conseguidas sin la adición de productos tales como glicina, como un compuesto aislado mezclado con ácido cítrico, la gelatina todavía puede ser comercializada como un producto natural.

- 15 Por lo tanto, la invención se refiere a un procedimiento de producción de un hidrolizado de gelatina que tiene un peso molecular medio de entre 100 y 2.000 DA, preferentemente de aproximadamente 1.500 Da, y un contenido medio de amina primaria de  $1,0 \times 10^{-3}$  a aproximadamente  $1,0 \times 10^{-2}$   $\mu\text{Mol}$  de amina primaria por  $\mu\text{g}$  de hidrolizado de gelatina. El procedimiento comprende, en primer lugar, poner en contacto un material de partida de gelatina con al menos una enzima proteolítica que tiene actividad endopeptidasa para formar un producto de gelatina digerido con endopeptidasa. A continuación, el producto de gelatina digerido con endopeptidasa se pone en contacto con al menos una enzima proteolítica que tiene actividad exopeptidasa. Generalmente, las digestiones proteolíticas con endopeptidasa y exopeptidasa proceden durante un tiempo suficiente y se realizan bajo condiciones de reacción con el fin de formar el hidrolizado de gelatina.

- 20 Una realización preferente de la invención abarca un procedimiento de fabricación de un hidrolizado de gelatina que comprende poner en contacto un material de partida de gelatina con una serie de al menos tres enzimas proteolíticas que tienen actividad endopeptidasa para formar un producto de gelatina digerido con endopeptidasa. Típicamente, las tres enzimas proteolíticas consisten en endopeptidasa de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, Corolase<sup>®</sup> 7089), bromelaína (por ejemplo, Enzeco<sup>®</sup> Bromelain Concentrate) y papaína (por ejemplo, Papain 6000L). A continuación, el producto de gelatina digerido con endopeptidasa se pone en contacto con una serie de al menos dos enzimas proteolíticas que tienen actividad exopeptidasa. En general, las dos enzimas proteolíticas consisten en exopeptidasa de *Aspergillus Oryzae* (por ejemplo, Validase<sup>®</sup> FPII) y exopeptidasa de *Aspergillus sojae* (por ejemplo, Corolase<sup>®</sup> LAP).

- 30 Un aspecto adicional de la invención proporciona un hidrolizado de gelatina. El hidrolizado de gelatina tiene un peso molecular medio de 100 a 2.000 Da, preferentemente de aproximadamente 1.500 Da y un contenido medio de amina primaria de entre  $1,0 \times 10^{-3}$  a  $1,0 \times 10^{-2}$   $\mu\text{Mol}$  de amina primaria por  $\mu\text{g}$  de hidrolizado de gelatina. El hidrolizado de gelatina se fabrica mediante un procedimiento que comprende, en primer lugar, poner en contacto un material de partida de gelatina con una serie de al menos tres enzimas proteolíticas que tienen actividad endopeptidasa para formar un producto de gelatina digerido con endopeptidasa. Típicamente, las tres enzimas proteolíticas se seleccionan de entre endopeptidasa de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, Corolase<sup>®</sup> 7089), bromelaína (por ejemplo, Enzeco<sup>®</sup> Bromelain concentrado) y papaína (por ejemplo, Papain 6000L). A continuación, el producto de gelatina digerido con endopeptidasa se pone en contacto con una serie de al menos dos enzimas proteolíticas que tienen actividad exopeptidasa. En general, las dos enzimas proteolíticas se seleccionan de entre exopeptidasa de *Aspergillus Oryzae* (por ejemplo, Validase<sup>®</sup> FPII) y exopeptidasa de *Aspergillus sojae* (por ejemplo, Corolase<sup>®</sup> LAP).

- 35 Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición de gelatina. La composición comprende el hidrolizado de gelatina de la invención y gelatina. La composición comprenderá entre el 1% y el 20% en peso del hidrolizado de gelatina y entre el 80% y el 99% en peso de gelatina.

Otros objetos y características de la invención serán en parte evidentes y en parte se indicarán más adelante en la presente memoria.

### 50 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra la reducción en la reticulación inducida por formaldehído de LH-1, una gelatina de cuero encalado, tras la adición de 2 hidrolizados de gelatina diferentes, Tipo BH-3 y Tipo LSHS, según se mide mediante el procedimiento de endurecimiento vorticial. El hidrolizado de Tipo BH-3 es un hidrolizado de cuero encalado de bajo peso molecular y el de Tipo LSHS es un hidrolizado de cuero encalado de la presente invención.

### Descripción de las realizaciones preferentes

La presente invención proporciona un nuevo hidrolizado de gelatina, un procedimiento de preparación de las composiciones de hidrolizado de gelatina y gelatina que comprenden el hidrolizado de gelatina. Se ha descubierto que la mezcla de un hidrolizado de gelatina de bajo peso molecular y, en particular, el hidrolizado de gelatina de la presente invención, con gelatina, reduce la tendencia a la reticulación de la gelatina y mejora sus propiedades de disolución mediante el aumento de las cantidades de glicina libre, otros aminoácidos y pequeños péptidos en el producto de gelatina mezclada. De manera ventajosa, la presente invención proporciona un medio rentable para reducir la reticulación de la gelatina con el beneficio de mantener la composición original de aminoácidos de la gelatina y sin la necesidad de añadir compuestos no derivados de gelatina, tales como ácido cítrico. Así, las composiciones de hidrolizado de gelatina de la presente invención todavía pueden ser comercializados como productos naturales.

#### I. Procedimiento de fabricación de hidrolizado de gelatina

Un aspecto de la presente invención abarca un procedimiento de producción de un hidrolizado de gelatina que tiene un peso molecular medio de 100 a 2.000 Da, preferentemente de aproximadamente 1.500 Da y un contenido medio de amina primaria de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-3}$  a  $1,0 \times 10^{-2}$   $\mu\text{Mol}$  de amina primaria por  $\mu\text{g}$  de hidrolizado de gelatina. El procedimiento comprende, en primer lugar, poner en contacto un material de partida de gelatina con al menos una enzima proteolítica que tiene actividad endopeptidasa para formar un producto de gelatina digerido con endopeptidasa. A continuación, el producto de gelatina digerido con endopeptidasa se pone en contacto con al menos una enzima proteolítica que tiene actividad exopeptidasa. Generalmente, las digestiones proteolíticas con endopeptidasa y exopeptidasa proceden durante un tiempo suficiente y se realizan bajo condiciones de reacción para formar el hidrolizado de gelatina.

Típicamente, el material de partida de gelatina usado en el procedimiento de la invención es derivado a partir de colágeno o un tejido rico en colágeno disponible a partir de varias materias primas adecuadas. Los tejidos ricos en colágeno incluyen la piel y los huesos de animales, tales como pescados, aves de corral, cerdos o ganado. En general, existen dos tipos principales de gelatina derivada a partir de colágeno, Tipo A y Tipo B, que difieren en su procedimiento de fabricación. En una realización, el material de partida de gelatina es gelatina de tipo A. El Tipo A, con un punto isoiónico de 7 a 10,0, es derivado a partir de colágeno exclusivamente con pretratamiento ácido mediante procedimientos conocidos generalmente en la técnica. En una realización alternativa, el material de partida de gelatina es gelatina de Tipo B. El Tipo B, con un punto isoiónico de 4,8 a 5,8, es el resultado de un tratamiento previo alcalino del colágeno y es producido mediante procedimientos conocidos generalmente en la técnica.

En otra realización alternativa, el material de partida de gelatina es una mezcla de Tipo A y Tipo B. Las cantidades respectivas de gelatina de Tipo A y Tipo B pueden variar ampliamente sin un efecto perjudicial sobre las propiedades del hidrolizado de gelatina producido.

En principio, cualquiera de las gelatinas de tipo A y B podría intercambiarse por completo o parcialmente por gelatina producida enzimáticamente. Sin embargo, hasta ahora, el procedimiento enzimático para la fabricación de gelatina no se usa ampliamente.

Independientemente de la realización, el material de partida de gelatina contendrá normalmente de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 90% en peso de proteína, de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 2% en peso de sales minerales (correspondiente al contenido de ceniza) y de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 15% en peso de agua.

También se contempla que las propiedades físicas del material de partida de gelatina puedan variar dependiendo del uso previsto del hidrolizado de gelatina. Típicamente, el material de partida de gelatina tendrá un peso molecular medio de aproximadamente 50.000 Da a aproximadamente 200.000 Da. En una realización particularmente preferente, el material de partida de gelatina tendrá un peso molecular medio de menos de aproximadamente 150.000 Da.

En una realización, la consistencia del material de partida de gelatina será de aproximadamente 50 a aproximadamente 300, el pH será de aproximadamente 3,8 a aproximadamente 7,5, el punto isoeléctrico será de aproximadamente 4,7 a aproximadamente 9,0, la viscosidad será de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 mP y la ceniza será de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 2,0%.

En una realización alternativa, cuando el material de partida de gelatina es sustancialmente gelatina de Tipo A, la consistencia será de aproximadamente 50 a aproximadamente 300, el pH será de aproximadamente 3,8 a aproximadamente 5,5, el punto isoeléctrico será de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,0, la viscosidad será de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 mP y la ceniza será de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 2,0%.

En una realización alternativa, cuando el material de partida de gelatina es sustancialmente gelatina de tipo B, la consistencia será de aproximadamente 50 a aproximadamente 300, el pH será de aproximadamente 5,0 a

aproximadamente 7,5, el punto isoeléctrico será de aproximadamente 4,7 a aproximadamente 5,4, la viscosidad será de aproximadamente 20 a aproximadamente 75 mP y la ceniza será de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 2,0%.

5 En una realización preferente, en la que se usa el hidrolizado de gelatina en la fabricación de productos farmacéuticos de cápsula dura, el material de partida de gelatina tendrá una consistencia de aproximadamente 200 a aproximadamente 300, una viscosidad de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 mP y un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5. En todavía otra realización preferente, en la que se usa el hidrolizado de gelatina en la fabricación de productos farmacéuticos de cápsula con cubierta dura, el material de partida de gelatina  
10 tendrá una consistencia de aproximadamente 125 a aproximadamente 200, una viscosidad de aproximadamente 25 a aproximadamente 45 mP y un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5.

En el procedimiento de la invención, típicamente, el material de partida de gelatina se mezcla o se disuelve en agua mediante un procedimiento conocido como la hinchamiento para formar una solución que comprende de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 60% en peso de gelatina. En una realización preferente, la solución tiene de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 50% en peso de gelatina.

15 En una realización preferente adicional, la solución tiene de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 50% en peso de gelatina. En una realización todavía más preferente, la solución tiene de aproximadamente el 35% a aproximadamente el 40% en peso de gelatina.

Se contempla que puedan usarse gelatinas que tengan tamaños de partícula diferentes en la invención como material de partida. Por ejemplo, el tamaño de partícula de gelatina puede variar de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 10 mm. En una realización, el tamaño de partícula de gelatina puede ser fino, con un tamaño medio de partícula de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,3 mm. En otra realización, el tamaño de partícula de gelatina puede ser medio, con un tamaño medio de partícula de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,8 mm. En todavía otra realización, el tamaño de partícula de gelatina puede ser grande, con un tamaño medio de partícula mayor de aproximadamente 0,8 mm. En términos generales, el tamaño de partícula del material de partida de gelatina  
20 afectará a la cantidad de tiempo necesaria para que la gelatina se disuelva en la solución. Durante el procedimiento de hinchamiento, se utiliza la capacidad de la gelatina para absorber hasta diez veces su peso en agua fría. Las gelatinas con un tamaño de partícula fino se hinchan en unos pocos minutos, las gelatinas con un tamaño de partícula medio se hinchan en aproximadamente 8 a aproximadamente 12 minutos, y las gelatinas con un tamaño de partícula grande se hinchan en aproximadamente una hora. Típicamente, las soluciones de gelatina de baja concentración, soluciones que  
25 tienen, por ejemplo, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20% en peso de gelatina, pueden ser preparadas usando todos los tamaños de partícula. Para las soluciones muy concentradas, soluciones que tienen, por ejemplo, de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 35% en peso de gelatina, típicamente, se usan partículas grandes ya que no tienden a agregarse y producen menos burbujas de aire cuando se está procesando.

Una vez preparada la solución con la gelatina mediante el procedimiento de hinchamiento y, típicamente, antes de la adición de las enzimas proteolíticas, el pH, la temperatura y estado Redox de la solución se ajustan típicamente para encargarse de las pequeñas cantidades de peróxido residual presentes en la gelatina desde su procedimiento de fabricación, para optimizar la reacción de hidrólisis y, en particular, para asegurar que las enzimas proteolíticas que contienen cisteína sean utilizadas en la función de reacción de hidrólisis cerca de su nivel de actividad óptima. El pH de la solución de gelatina se ajusta y se mantiene a entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7. En una realización particularmente preferente, el pH de la solución de gelatina se ajusta y se mantiene a entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 6,5. A este pH, las enzimas proteolíticas detalladas más adelante están cerca de su nivel de actividad óptima. El pH de la solución de gelatina puede ser ajustado y controlado según procedimientos conocidos generalmente en la técnica. Por ejemplo, para disminuir el pH de la solución de gelatina típicamente se añade un ácido, tal como ácido clorhídrico. De manera alternativa, para aumentar el pH de la solución de gelatina, típicamente se añade una base, tal como hidróxido de sodio. Preferentemente, la temperatura de la solución de gelatina se ajusta y se mantiene entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 65°C durante la reacción de hidrólisis según procedimientos conocidos en la técnica. En una realización particularmente preferente, la temperatura de la solución de gelatina se ajusta y se mantiene a entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 60°C durante la reacción de hidrólisis. En general, las temperaturas por encima de este intervalo pueden desactivar las enzimas proteolíticas, mientras que las temperaturas por debajo de este intervalo tienden a ralentizar la actividad de las enzimas proteolíticas. Dependiendo de la enzima proteolítica usada en la reacción de hidrólisis, típicamente el estado Redox de la solución de gelatina debería ajustarse y mantenerse como neutro a ligeramente en el lado reductor. Los altos niveles de oxidantes tienden a inactivar algunas de las enzimas proteolíticas que contienen cisteína usadas en la reacción de hidrólisis, mientras que los bajos niveles de agentes reductores pueden servir para mantener algunas de las enzimas proteolíticas, tales como papaína, activas hasta que se desactivan.  
55

En general, la reacción de hidrólisis se realiza mediante la adición de enzimas proteolíticas a la solución de gelatina. Varias enzimas proteolíticas son adecuadas para su uso en el procedimiento de la invención. En una realización

preferente, las enzimas proteolíticas serán enzimas de calidad alimentaria que tienen actividad endopeptidasa o exopeptidasa a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7 y a una temperatura de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 65 °C. En una realización particularmente preferente, las enzimas proteolíticas serán enzimas de calidad alimentaria que tienen actividad endopeptidasa o exopeptidasa a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 6,5 y a una temperatura de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C.

En una realización, la endopeptidasa será una serina proteinasa de calidad alimentaria que pertenece a EC 3.4.21. En una alternativa de esta realización, la serina proteinasa es una quimotripsina proteinasa. En una alternativa adicional de esta realización, la serina proteinasa es una subtilisina proteinasa. En otra realización, la endopeptidasa será una cisteína proteinasa de calidad alimentaria que pertenece a EC 3.4.22. En todavía otra realización, la endopeptidasa será una proteinasa aspártica de calidad alimentaria que pertenece a EC 3.4.23. En una realización adicional, la endopeptidasa será una metaloproteinasa de calidad alimentaria que pertenece a EC 3.4.24. Los ejemplos no limitativos ejemplares de endopeptidasas de calidad alimentaria que pueden ser utilizadas en el procedimiento de la invención incluyen Validase<sup>®</sup> AFP, Validase<sup>®</sup> FP 500, concentrado de proteasa alcalina, Validase<sup>®</sup> TSP, Enzeco<sup>®</sup> Bromelain Concentrate, Corolase<sup>®</sup> 7089, Papain 600L y Validase<sup>®</sup> Papain Concentrate libre de sulfito.

En una realización adicional, la exopeptidasa será una amino peptidasa de calidad alimentaria que pertenece a EC 3.4.11. En otra realización, la exopeptidasa será una dipeptidasa de calidad alimentaria que pertenece a EC 3.4.13. En todavía otra realización, la exopeptidasa será una peptidil di- o tripeptidasa de calidad alimentaria que pertenece a EC 3.4.14. En todavía otra realización, la exopeptidasa será una peptidoldipeptidasa de calidad alimentaria que pertenece a EC 3.4.15. En una realización adicional, la exopeptidasa será una carboxi peptidasa de tipo serina de calidad alimentaria que pertenece a EC 3.4.16. En todavía otra realización, la exopeptidasa será una metalo carboxi peptidasa de calidad alimentaria que pertenece a EC 3.4.17. En una realización adicional, la exopeptidasa será una carboxi peptidasa de tipo cisteína de calidad alimentaria que pertenece a EC 3.4.18. En todavía otra realización, la exopeptidasa será una omega peptidasa de calidad alimentaria que pertenece a EC 3.4.19. Un ejemplo de una exopeptidasa de calidad alimentaria que puede ser utilizada en el procedimiento de la invención incluye Validase<sup>®</sup> FP II o Corolase<sup>®</sup> LAP.

Otro ejemplo de una enzima hidrolítica de calidad alimentaria que puede ser usada en el procedimiento de la invención es Validase<sup>®</sup> FP Concentrate. Los ejemplos de otras enzimas proteolíticas de calidad alimentaria, adecuadas, se muestran en la Tabla A.

Tabla A

Enzima proteolítica	Fuente
Alcalase <sup>®</sup>	Novoenzymes
Flavourzyme <sup>®</sup>	Novoenzymes
Protamex <sup>®</sup>	Novoenzymes
Fungal Protease Concentrate	Genencor Enzymes
Fungal Protease 500.000	Genencor Enzymes
Protex <sup>™</sup> 6L	Genencor Enzymes
Multifect <sup>®</sup> P-3000	Genencor Enzymes
Multifect <sup>®</sup> Neutral	Genencor Enzymes
Corolase <sup>®</sup> TS	AB Enzymes
Corolase <sup>®</sup> PP	AB Enzymes
Enzeco <sup>®</sup> Chymotrypsin 1:1	Enzeco Development Corp.
Enzeco <sup>®</sup> Trypsin 1200	Enzeco Development Corp.
Enzeco <sup>®</sup> Trypsin 6	Enzeco Development Corp.
Enzeco <sup>®</sup> Ficin	Enzeco Development Corp.

(Cont.)

Enzeco® Fungal Acid Protease	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Fungal Protease 100	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Fungal Protease 180	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Fungal Protease 400	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Exo-Protease	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Neutral Bacterial Protease 2X	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Neutral Bacterial Protease 160K	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Glutaminase ADK	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Alkaline Protease L-600 FG	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Alkaline Protease 44MG	Enzeco Development Corp.
Enzeco® Alkaline Protease 66L	Enzeco Development Corp.
HT-Proteolytic	Deerland Enzymes
BC Pepsin 3000_P389P-3	Biocatalysts
BC Pepsin 10000_P389P-10	Biocatalysts
Promod™ 144MG	Biocatalysts
Promod™ 144L	Biocatalysts
Promod™ 144P	Biocatalysts
Promod™ 192P	Biocatalysts
Promod™ 194P	Biocatalysts
Promod™ 278P	Biocatalysts
Promod™ 279P	Biocatalysts
Promod™ 298L	Biocatalysts
Promod™ 439L	Biocatalysts
Promod™ 648L	Biocatalysts
Promod™ 671L	Biocatalysts

- Típicamente, se usarán combinaciones de endopeptidasas y exopeptidasas para catalizar la reacción de hidrólisis. Preferentemente, las enzimas proteolíticas se seleccionan teniendo en cuenta la actividad proteasa de las enzimas y seleccionando las enzimas que maximicen la escisión de los enlaces peptídicos en el material de partida de gelatina. Según la invención, las enzimas con actividad endopeptidasa preferencial se añaden a la solución de gelatina en primer lugar para formar un producto de gelatina digerido con endopeptidasa. A continuación, el producto de gelatina digerido con endopeptidasa se pone en contacto con enzimas que tienen actividad exopeptidasa preferencial sin desactivar la endopeptidasa o las endopeptidasas.
- 5
- 10 En una realización preferida, la endopeptidasa se selecciona de entre el grupo que consiste en Corolase® 7089, Validase® AFP, Validase® FP 500, concentrado de proteasa alcalina, Validase® TSP, Enzeco® Bromelain Concentrate, Papain 6000L y Validase® Papain Concentrate libre de sulfito; y la exopeptidasa es Validase® FP II o Corolase® LAP. En todavía otra realización, la endopeptidasa se selecciona de entre el grupo que consiste en Corolase® 7089, Enzeco® Bromelain Concentrate y Papain 6000L, y la exopeptidasa se selecciona de entre el grupo que consiste en Validase®

FPII y Corolase® LAP. En una realización preferida, cada enzima proteolítica es añadida secuencialmente al material de partida de gelatina en el siguiente orden: Corolase® 7089, Enzeco® Bromelain Concentrate, Papain 6000L, Validase® FPII y Corolase® LAP. En una alternativa de esta realización, cada enzima proteolítica digiere el material de partida de gelatina durante aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 horas antes de la adición de la subsiguiente enzima proteolítica.

La cantidad de enzima proteolítica añadida a la reacción de hidrólisis puede variar y variará en función del grado deseado de hidrólisis de gelatina y la duración de la reacción de hidrólisis. En general, se añade de aproximadamente el 0,025% a aproximadamente el 0,15% (p/p) de la enzima proteolítica que tiene actividad endopeptidasa y se añade de aproximadamente el 0,025% a aproximadamente el 0,15% (p/p) de la enzima proteolítica que tiene actividad exopeptidasa para una reacción de hidrólisis con una duración de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 24 horas. En una realización preferida, se añaden de aproximadamente el 0,05% a aproximadamente el 0,15% (p/p) de Corolase® 7089, de aproximadamente el 0,025% a aproximadamente el 0,075% (p/p) de Enzeco® Bromelain Concentrate, de aproximadamente el 0,05% a aproximadamente el 0,15% (p/p) de Papain 6000L, de aproximadamente el 0,025% a aproximadamente el 0,075% (p/p) de Validase® FPII y de aproximadamente el 0,05% a aproximadamente el 0,15% (p/p) de Corolase® LAP al material de partida de gelatina.

Típicamente, la reacción de hidrólisis procederá durante un máximo de aproximadamente 24 horas. Típicamente, después de aproximadamente 24 horas, la calidad del hidrolizado de gelatina, en términos de color y olor, comenzará a disminuir notablemente. En otra realización, la reacción de hidrólisis procederá durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas. En todavía otra realización, la reacción de hidrólisis procederá durante aproximadamente 3 horas a aproximadamente 15 horas. En una realización todavía más preferente, la reacción de hidrólisis procederá durante aproximadamente 5 horas a aproximadamente 12 horas. Dentro de este período de tiempo, pueden conseguirse fácilmente condiciones de proceso altamente económicas y una calidad constante del hidrolizado de gelatina. Para finalizar la reacción de hidrólisis, la solución de gelatina hidrolizada puede ser calentada a aproximadamente 90°C para desactivar las enzimas proteolíticas. Puede requerirse una etapa adicional para desactivar las cisteína proteasas. Si es necesario, puede añadirse la adición de peróxido de hidrógeno u otro agente oxidante, en general, de manera que no exceda 1.000 ppm. A continuación, el hidrolizado de gelatina puede ser purificado a partir de la solución de hidrólisis mediante cualquier medio generalmente conocido en la técnica, por ejemplo microfiltración.

Típicamente, el grado de hidrólisis (DH) del material de partida de gelatina en el procedimiento de la invención es mayor que aproximadamente el 13%. En ciertas realizaciones, el DH es de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20%. En otras realizaciones, el DH es de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 30%. En otra realización, el DH es de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 40%. En todavía otra realización, el DH es de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 50%. En todavía otra realización, el DH es de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 60%. En una realización adicional, el DH es de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 70%. En todavía una realización adicional, el DH es de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 80%. En todavía otra realización, el DH es de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 90%. En todavía otra realización, el DH es mayor que aproximadamente el 90%. El DH es el porcentaje del número total de enlaces peptídicos en el material de partida de gelatina que han sido hidrolizados por las enzimas proteolíticas. El DH puede calcularse mediante procedimientos generalmente conocidos en la técnica, tales como según el procedimiento de Adler-Nissen (19).

Se ha observado que los hidrolizados de gelatina con un menor peso molecular medio son más eficaces en la prevención del proceso de reticulación. Como consecuencia, puede reducirse la cantidad de hidrolizado en la formulación de gelatina, lo que optimiza los costes.

## II. Hidrolizado de gelatina

Todavía otro aspecto de la invención abarca un hidrolizado de gelatina fabricado mediante el procedimiento de la invención. En términos generales, el hidrolizado de gelatina, en comparación con el material de partida de gelatina, comprenderá una mezcla de péptidos de diferentes longitudes que tienen una mayor cantidad de glicina libre, otros aminoácidos y pequeños péptidos. El hidrolizado de gelatina tendrá también un menor peso molecular medio y un mayor contenido de amina primaria en comparación con el material de partida de gelatina.

El hidrolizado de gelatina tiene un peso molecular medio de aproximadamente 100 Da a aproximadamente 2.000 Da. En otras realizaciones, el hidrolizado de gelatina tendrá un peso molecular medio de aproximadamente 700 Da a aproximadamente 1.800 Da. En otra realización, el hidrolizado de gelatina tendrá un peso molecular medio de aproximadamente 700 Da a aproximadamente 1.500 Da. En todavía otras realizaciones, el hidrolizado de gelatina tendrá un peso molecular medio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 1.200 Da.

El peso molecular medio es el peso de un hidrolizado de según se mide mediante espectrometría de masas - cromatografía líquida de ionización mediante electro-pulverización (ESI-LC/MS). Por ejemplo, un hidrolizado de gelatina que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 1.200 Da puede tener un peso molecular incluido en un



intervalo de aproximadamente 75 Da a 8.000 Da.

El hidrolizado de gelatina tiene un contenido medio de amina primaria de no menos de  $1,0 \times 10^{-3}$   $\mu$ moles de amina primaria por  $\mu$ g de hidrolizado de gelatina. En otra realización, el hidrolizado de gelatina tendrá un contenido medio de amina primaria de no menos de aproximadamente  $1,5 \times 10^{-3}$   $\mu$ moles de amina primaria por  $\mu$ g de hidrolizado de gelatina. En todavía otra realización, el hidrolizado de gelatina tendrá un contenido medio de amina primaria de no menos de aproximadamente  $2,0 \times 10^{-3}$   $\mu$ moles de amina primaria por  $\mu$ g de hidrolizado de gelatina. El hidrolizado de gelatina tiene un contenido medio de amina primaria de  $1,0 \times 10^{-3}$  a  $1,0 \times 10^{-2}$   $\mu$ moles de amina primaria por  $\mu$ g de hidrolizado de gelatina. El contenido de amina primaria del hidrolizado de gelatina se mide mediante derivación y posterior absorción UV (6-8), tal como se ilustra en los Ejemplos.

Típicamente, el hidrolizado de gelatina de la presente invención comprende polipéptidos de hasta aproximadamente 75 aminoácidos de longitud, preferiblemente de hasta 50 aminoácidos de longitud. En una realización, el polipéptido medio que comprende el hidrolizado de gelatina es de aproximadamente 6 a aproximadamente 18 aminoácidos de longitud. En otra realización, el polipéptido medio contenido en el hidrolizado de gelatina de la presente invención es de aproximadamente 9 a aproximadamente 20 aminoácidos de longitud. La longitud de una cadena polipeptídica puede ser determinada indirectamente mediante cromatografía de exclusión por tamaño/cromatografía líquida de alto rendimiento (SEC/HPLC).

En una realización, el hidrolizado de gelatina tendrán un peso molecular medio de aproximadamente 100 Da a aproximadamente 2.000 Da, un contenido medio de amina primaria de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-3}$  a  $1,0 \times 10^{-2}$   $\mu$ moles de amina primaria por  $\mu$ g de hidrolizado de gelatina, y una longitud media de polipéptido de hasta aproximadamente 20 aminoácidos. En todavía otra realización, el hidrolizado de gelatina tendrá un peso molecular medio de aproximadamente 700 Da a aproximadamente 1.500 Da, un contenido medio de amina primaria de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-3}$  a  $2,0 \times 10^{-3}$   $\mu$ moles de amina primaria por  $\mu$ g de hidrolizado de gelatina, y una longitud media de polipéptido de hasta aproximadamente 18 aminoácidos. En otra realización, el hidrolizado de gelatina tendrá un peso molecular medio de aproximadamente 800 Da a aproximadamente 1.200 Da, un contenido medio de amina primaria de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-3}$  a  $2,0 \times 10^{-3}$   $\mu$ moles de amina primaria por  $\mu$ g de hidrolizado de gelatina, y una longitud media de polipéptido de aproximadamente 4 a aproximadamente 18 aminoácidos.

### III. Composiciones de gelatina

Otro aspecto de la invención abarca una composición de gelatina que comprende el hidrolizado de gelatina de bajo peso molecular según la invención y gelatina. Sorprendentemente, se ha encontrado que cuando un hidrolizado de gelatina de bajo peso molecular se mezcla con una gelatina de mayor peso molecular, reduce la reticulación de la gelatina y mejora las propiedades de disolución mediante el aumento de las cantidades de glicina libre, otros aminoácidos y pequeños péptidos en el producto mezclado de gelatina, tal como se muestra en los Ejemplos.

Típicamente, los hidrolizados de gelatina tendrán un peso molecular bajo. En una realización, el peso molecular medio será de aproximadamente 400 Da a aproximadamente 2.000 Da. En otra realización, el hidrolizado de gelatina tendrá un peso molecular medio de aproximadamente 700 Da a aproximadamente 1.500 Da. Además, el hidrolizado de gelatina tendrá también un contenido medio de amina primaria comprendido en el intervalo de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-3}$  a  $1,0 \times 10^{-2}$   $\mu$ moles de amina primaria por  $\mu$ g de hidrolizado de gelatina.

En otra realización, el contenido medio de amina primaria puede variar de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-3}$  a aproximadamente  $2,0 \times 10^{-3}$   $\mu$ moles de amina primaria por  $\mu$ g de hidrolizado de gelatina.

En todavía otra realización, el contenido medio de amina primaria puede estar comprendido entre aproximadamente  $2,0 \times 10^{-3}$  y aproximadamente  $4,0 \times 10^{-3}$   $\mu$ moles de amina primaria por  $\mu$ g de hidrolizado de gelatina. En todavía otra realización, el contenido medio de amina primaria puede estar comprendido entre aproximadamente  $4,0 \times 10^{-3}$  y aproximadamente  $6,0 \times 10^{-3}$   $\mu$ moles de amina primaria por  $\mu$ g de hidrolizado de gelatina. En todavía una realización adicional, el contenido medio de amina primaria puede estar comprendido entre aproximadamente  $6,0 \times 10^{-3}$  y  $1,0 \times 10^{-2}$   $\mu$ moles de amina primaria por  $\mu$ g de hidrolizado de gelatina.

Generalmente, el hidrolizado de gelatina tendrá también una longitud media de cadena polipeptídica de aproximadamente 4 a aproximadamente 50 aminoácidos. En una realización, el polipéptido medio que comprende el hidrolizado de gelatina es de hasta aproximadamente 30 aminoácidos de longitud. En otra realización, el polipéptido medio que comprende el hidrolizado de gelatina es de aproximadamente 9 a aproximadamente 20 aminoácidos de longitud. El peso molecular medio, el contenido medio de amina primaria y la longitud media de cadena polipeptídica se determinan tal como se detalla en la sección II.

En una realización preferida, el hidrolizado de gelatina usado en la composición será el hidrolizado de la presente invención, según se detalla en la sección II. Los ejemplos de otros hidrolizados de gelatina ejemplares que pueden ser usados en la composición se detallan en la Tabla B. Pueden usarse también mezclas de los hidrolizados de gelatina

descritos anteriormente.

Tabla B

Hidrolizados de gelatina GELITA	Ubicación donde se fabrica GELITA	Materia prima	Peso molecular	Viscosidad
Tipo A-2	Europa	Piel porcina	2,5-4,5 kDa	30-60 mP (25%@20°C)
Tipo A-3	Chicago	Piel porcina	2,5-3,0 kDa	40-60 mP (25%@25°C)
Tipo BH-1	Europa	Piel bovina	2,0-4,0 kDa	32-47 mP (20%@25°C)
Tipo BH-2	Europa	Piel bovina	2,0-4,0 kDa	32-47 mP (20%@25°C)
Tipo A-5	Sioux City	Piel porcina	2,0-4,0 kDa	42-71 mP (20%@25°C)
Tipo BB-1	Sioux City	Piel bovina	2,0-4,0 kDa	42-90 mP (20%@25°C)
Tipo BB-2	Sioux City	Piel bovina	2,0-4,0 kDa	20-40 mP (20%@25°C)
Tipo BBH-1	Europa	Hueso/piel bovina	2,0-4,0 kDa	32-50 mP (20%@25°C)
Tipo BB-3	Chicago	Hueso bovino	2,0-4,0 kDa	30-50 mP (20%@25°C)
Tipo BB-4	Chicago	Hueso bovino	2,0-4,0 kDa	30-50 mP (20%@25°C)
Tipo BB-5	Chicago	Hueso bovino	2,0-4,0 kDa	42-90 mP (20%@25°C)
Tipo BB-6	Chicago	Hueso bovino	2,0-4,0 kDa	42-90 mP (20%@25°C)
Tipo A-6	Chicago	Piel porcina	2,0-4,0 kDa	30-60 mP (20%@25°C)
Tipo A-7	Chicago	Piel porcina	2,0-4,0 kDa	30-60 mP (20%@25°C)
Tipo A-8	Sudamérica	Piel porcina	2,0-4,0 kDa	30-60 mP (20%@25°C)
Tipo BH-3	Sudamérica	Piel bovina	2,0-4,0 kDa	30-60 mP (20%@25°C)

5 El hidrolizado de gelatina puede ser mezclado con varios tipos de gelatina que tienen una amplia gama de propiedades físicas y funcionales. La elección de una gelatina particular puede variar y variará en gran medida dependiendo del uso previsto de la composición de gelatina. En términos generales, independientemente de la realización o el uso previsto, típicamente, la gelatina es derivada a partir de colágeno o tejido rico en colágeno disponible a partir de varias materias primas adecuadas, tales como a partir de la piel y los huesos de animales. En una realización, la gelatina es gelatina de Tipo A. En otra realización, la gelatina es gelatina de Tipo B. En todavía otra realización, la gelatina es una mezcla de gelatina de Tipo A y Tipo B. Una vez más, la gelatina preparada en un proceso enzimático puede ser usada para sustituir la gelatina de Tipo A y/o de Tipo B.

10 La gelatina, independientemente de la realización, contendrá preferiblemente de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 90% en peso de proteína, de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 2% en peso de sales minerales (contenido de cenizas) y de aproximadamente el 10% al 15% en peso de agua.

15 Típicamente, la gelatina tendrá un alto peso molecular medio. En una realización, la gelatina tendrá un peso molecular medio mayor de aproximadamente 200.000 Da. En otra realización, la gelatina tendrá un peso molecular medio mayor de aproximadamente 150.000 Da. En todavía otra realización, la gelatina tendrá un peso molecular medio de aproximadamente 100.000 Da a aproximadamente 200.000 Da.

20 En una realización, la consistencia de la gelatina será de aproximadamente 50 a aproximadamente 300, el pH será de aproximadamente 3,8 a aproximadamente 7,5, el punto isoeléctrico será de aproximadamente 4,7 a aproximadamente 9,0, la viscosidad será de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 mP y la ceniza será de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 2,0%.

En una realización alternativa cuando la gelatina es gelatina sustancialmente de tipo A, la consistencia será de aproximadamente 50 a aproximadamente 300, el pH será de aproximadamente 3,8 a aproximadamente 5,5, el punto

isoeléctrico será de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 10,0, la viscosidad será de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 mP y la ceniza será de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 2,0%.

5 En una realización alternativa cuando la gelatina es una gelatina sustancialmente de tipo B, la consistencia será de aproximadamente 50 a aproximadamente 300, el pH será de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,5, el punto isoeléctrico será de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,8, la viscosidad será de aproximadamente 20 a aproximadamente 75 mP y la ceniza será de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 2,0%.

10 En una realización preferida en la que la composición de gelatina es usada en la fabricación de productos farmacéuticos con cápsula dura, la gelatina tendrá una consistencia de aproximadamente 200 a aproximadamente 300, una viscosidad de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 mP y un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5.

En todavía otra realización preferida en la que la composición de gelatina es usada en la fabricación de productos farmacéuticos con cápsula de cubierta dura, la gelatina tendrá una consistencia de aproximadamente 125 a aproximadamente 200, una viscosidad de aproximadamente 25 a aproximadamente 45 mP y un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5.

15 La composición de gelatina de la invención comprenderá generalmente de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 20% en peso del hidrolizado de gelatina y de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 99% en peso de la gelatina. En otra realización, la composición de gelatina comprenderá de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 5% en peso de hidrolizado de gelatina y de aproximadamente el 95% a aproximadamente el 99% en peso de gelatina. En todavía otra realización, la composición de gelatina comprenderá de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 10% en peso del hidrolizado de gelatina y de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 95% en peso de gelatina. En otra realización, la composición de gelatina comprenderá de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 15% en peso del hidrolizado de gelatina y de aproximadamente el 85% a aproximadamente el 90% en peso de gelatina. En una realización adicional, la composición de gelatina comprenderá de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 20% en peso del hidrolizado de gelatina y de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 85% en peso de gelatina. En una realización típica, la composición de gelatina comprenderá una proporción de hidrolizado de gelatina a gelatina de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:99 (p/p).

20

25

30 En una realización preferida, la composición de gelatina comprenderá el hidrolizado de gelatina de la presente invención y una gelatina de mayor peso molecular, de calidad farmacéutica. En una realización, la composición de gelatina comprenderá de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 10% en peso del hidrolizado de gelatina y de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 95% en peso de gelatina de calidad farmacéutica. En otra realización, la composición de gelatina comprenderá de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 15% en peso del hidrolizado de gelatina y de aproximadamente el 85% a aproximadamente el 90% en peso de gelatina de calidad farmacéutica.

35 De manera ventajosa, las composiciones de gelatina de la presente invención y de esta realización tiene típicamente una reticulación reducida según se mide mediante el ensayo de endurecimiento vorticial y el ensayo de viscosidad. Típicamente, las composiciones de gelatina de esta realización tienen un tiempo de endurecimiento vorticial de aproximadamente 200 a aproximadamente 300 segundos. En otra realización, el tiempo de endurecimiento vorticial es mayor que aproximadamente 300 segundos. El procedimiento para la determinación del tiempo de endurecimiento vorticial se describe en los Ejemplos. Típicamente, las composiciones de gelatina de esta realización tienen también una viscosidad inicial media de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 cP y después de la adición de menos de aproximadamente el 0,5% en peso de [2-(4-dimetil-carbamoil-piridino)-etano-1-sulfonato] (OB1207<sup>®</sup> de H.W. Sands Corporation) a la composición de gelatina durante aproximadamente dos horas a una temperatura de reacción de aproximadamente 60°C, la composición de gelatina tiene una viscosidad media de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 cP. El procedimiento para medir la viscosidad se describe en los ejemplos.

40

45 En una realización, puede añadirse glicina como un compuesto separado a la composición de gelatina de la invención. La glicina puede ser añadida a la composición de gelatina en una cantidad de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 5% en peso. En una realización más típica, la cantidad de glicina será de aproximadamente el 1,5% a aproximadamente el 2,5% en peso. En todavía otra realización, el ácido cítrico puede ser añadido a la composición de gelatina. El ácido cítrico puede ser añadido en una cantidad de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 5% en peso. En una realización más típica, se añade ácido cítrico a la composición de gelatina en una cantidad de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 1,5%.

50

55 La composición de gelatina de la invención puede ser empleada en diversas aplicaciones, incluyendo como un ingrediente alimentario, como un ingrediente cosmético y como un ingrediente fotográfico. Debido a que la menor tendencia de la composición de gelatina a la reticulación y las mejores propiedades de disolución, en una realización preferida, la composición de gelatina es usada en la fabricación de productos farmacéuticos.

5 En una realización preferida, la composición de gelatina es usada en la fabricación de cápsulas de gelatina dura. Tal como se ha detallado anteriormente, cuando la composición de gelatina se usa en la fabricación de productos farmacéuticos de cápsula dura, la gelatina tendrá una consistencia de aproximadamente 200 a aproximadamente 300, una viscosidad de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 mP y un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6.5. Una formulación de cápsula dura típica comprenderá aproximadamente el 30% en peso de la composición de gelatina de la invención, aproximadamente el 65% en peso de agua, aproximadamente el 5% en peso de un colorante adecuado, y contendrá un pigmento, según sea necesario. Las cápsulas de gelatina dura pueden ser fabricadas según cualquier procedimiento generalmente conocido en la técnica.

10 En todavía otra realización preferida, la composición de gelatina es usada en la fabricación de cápsulas de gelatina blanda. Tal como se ha descrito anteriormente, cuando la composición de gelatina es usada en la fabricación de productos farmacéuticos de cápsula de cubierta blanda, la gelatina tendrá una consistencia de aproximadamente 125 a aproximadamente 200, una viscosidad de aproximadamente 25 a aproximadamente 45 mP y un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5. Una formulación de gelatina de cápsula blanda típica comprenderá de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 45% en peso de la composición de gelatina de la invención, de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 35% en peso de plastificante y de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 45% en peso de agua. Las cápsulas de gelatina blanda pueden ser fabricadas según cualquier procedimiento conocido generalmente en la técnica. Los ejemplos típicos de plastificantes son glicerol (usado generalmente en forma de una solución acuosa al 85% en peso) y sorbitol (usado generalmente en la forma de una solución acuosa al 70% en peso) y sus mezclas.

20 Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patentes y otras referencias citadas en la presente memoria se incorporan a la presente memoria por referencia en su totalidad, como si cada publicación, patente, solicitud de patente u otra referencia individual estuviese indicado específica e individualmente para ser incorporado, por referencia.

#### Definiciones

"Anfótero" es una sustancia que puede tener tanto carácter catiónico como aniónico, tal como una proteína.

25 "Consistencia" es el grado de firmeza de un gel, medido en gramos. El valor de la consistencia es la fuerza requerida para que un punzón de una forma y una dimensión definidas penetre 4 mm de profundidad en la superficie de una solución de gelatina del 6,7% en peso. Los valores de consistencia de las gelatinas disponibles comercialmente están comprendidos entre 80 y 280.

30 "Hueso astillado" es hueso astillado, desengrasado y secado a partir del cual, después de una desmineralización (véase maceración), se produce gelatina.

"Reticulación" se refiere a los mecanismos mediante los cuales se forma, por ejemplo, una película sobre una cápsula farmacéutica blanda. Típicamente, la reticulación disminuye las propiedades de disolución de la cápsula.

"Da" es una abreviatura de Dalton.

35 "EC" es una abreviatura de Clasificación de Enzimas. Típicamente, se usa como un prefijo en la designación numérica de una enzima.

"Endopetidasa" es una enzima que típicamente pertenece a la subclase EC 3.4, hidrolasas peptídicas, que hidroliza los enlaces peptídicos no terminales en oligopéptidos o polipéptidos y que comprende cualquier subclase de enzima EC 3.4.21-99.

40 "Exopeptidasa" es una enzima de un grupo de hidrolasas peptídicas en la subclase EC 3.4 que cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos contiguos al terminal amino grupo o carboxilo de un oligopéptido o polipéptido. Típicamente, el grupo abarca las subclases de enzimas 3.4.11-3.4.19.

"Enzima de calidad alimentaria" es una enzima que típicamente está libre de organismos genéticamente y es segura cuando es consumida por un organismo, tal como un ser humano. Típicamente, la enzima y el producto a partir del cual puede ser derivada la enzima se producen según las directrices aplicables de la FDA.

45 "Cápsulas duras" son cápsulas huecas de diversos tamaños, realizadas en gelatina pura con o sin la adición de colorante. Comprenden una parte superior e inferior, las cuales se unen entre sí una vez que completado el llenado.

"Gelatina instantánea" es una gelatina en polvo capaz de hincharse en agua fría.

"Microgel" se considera que es gelatina con un peso molecular mayor de 300.000 Da.

50 "Escleroproteínas" son aquellas proteínas que proporcionan una función de soporte en el cuerpo. Son insolubles en agua y poseen una estructura fibrosa. Estas proteínas incluyen, por ejemplo, queratina que se produce en el cabello y

las uñas, las elastinas y las colágenos que se producen en el tejido de soporte y conectivo, piel, hueso y cartílago.

"Cápsulas blandas" son cápsulas elásticas realizadas en gelatina para ser llenadas con mezcla de ingrediente activo/excipientes. Pueden ser producidas con diferentes espesores de pared, con o sin una costura.

"Split" es una materia prima de gelatina; capa intermedia del tejido conectivo de la piel de ganado.

5 "Triple hélice" es una estructura básica de colágeno que consiste en 3 cadenas de proteínas. Frecuentemente, estas poseen secuencias de aminoácidos algo diferentes.

"Gelatina de Tipo A" es gelatina digerida con ácido.

"Gelatina de Tipo B" es gelatina digerida con álcali (básica).

10 "Tipo LBSH" es un hidrolizado de hueso tratado con cal de la presente invención producido mediante digestión proteolítica de gelatina.

"Tipo LSH" es un hidrolizado de piel tratado con cal de la presente invención producido mediante digestión proteolítica de gelatina.

15 Debido a que podrían realizarse diversos cambios en los compuestos, productos y procedimientos anteriores sin apartarse del alcance de la invención, se pretende que toda la materia contenida en la descripción anterior y en los ejemplos proporcionados a continuación, sea interpretada como ilustrativa y no en un sentido limitativo.

### Ejemplos

Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

#### Ejemplo 1

20 El hidrolizado de gelatina de la invención puede fabricarse según el procedimiento siguiente. Se preparó una solución que contenía el 34% en peso de gelatina (gelatina de hueso encalado de tipo B, Consistencia = 100) mediante la adición de 1,94 kg de agua a 1,0 kg de gelatina procesada desionizada. La gelatina se dejó hidratar durante 1 hora y a continuación se colocó en un baño de agua a 55°C para su disolución. Una vez completamente disuelta, el pH de la solución de gelatina se ajustó a 6,0-6,5 con hidróxido de sodio acuoso. Se añadió cloruro de calcio a la solución de gelatina en la cantidad de 0,037% p/p, con la cantidad de gelatina en solución (CDG – Commercial Dry Gelatine (que tenía un contenido de humedad de aproximadamente el 10% en peso), todas las adiciones en este procedimiento se basaron en esta cantidad). Se tomó una parte alícuota y se diluyó al 5% en peso con el fin de comprobar el estado Redox de la solución. Se usaron tiras de ensayo de peróxido (EM Science) para medir rápidamente la cantidad de peróxido. Si el peróxido estaba presente, se añadió Fermcolase® 1000F (Genencor International Inc.) en incrementos de 0,5 ml. Después de cada adición, la solución se dejó reaccionar durante 30 minutos antes de repetir la medición de peróxido. Las adiciones de Fermcolase® 1000F se repitieron hasta que el nivel de peróxido se acercó a cero.

35 Se añadió Corolase® 7089 (AB enzimas) a la solución en la cantidad de 0,1% p/p. Casi al final del tiempo de reacción de 1 hora y antes de la adición de la siguiente enzima, se tomó una pequeña muestra y se analizó el peso molecular. Este procedimiento se repitió para cada una de las adiciones de enzimas. Después de un tiempo de reacción de 1 hora, se añadió 0,05% p/p de Enzeco® Bromelain Concentrate (Enzyme Development Corp.) y la solución se dejó reaccionar durante una hora adicional. A continuación, se añadió Papain 6000L líquida (Valley Research) al 0,1% p/p. Después de 1 hora, se añadió el 0,05% p/p de Validase® FPII (Valley Research) a la solución y se hizo reaccionar durante otra hora. La adición de la enzima final fue de 0,1% p/p de Corolase® LAP (AB Enzymes). Después de 1 hora, la solución se calentó a 90°C para desactivar las enzimas funcionales restantes. En algunos casos, se añadió 30-40 ppm adicional de peróxido de hidrógeno para tener la certeza de que la Papain 6000L fue desactivada. No se observaron pruebas de actividad enzimática después de la desactivación térmica. En la Tabla 1 se proporciona un resumen que enumera los detalles de las cinco enzimas usadas durante la hidrólisis.

Tabla 1

Nombre	Tipo de enzima	Fuente	Rangos óptimos	Suministrador
Corolase® 7089	Proteasa - endopeptidasa	Microbiana <i>bacillus subtilis</i>	<60 °C pH 5-7,5	AB Enzymes

(Cont.)

Enzeco <sup>®</sup> Bromelain Concentrate	Proteasa - endopeptidasa	Planta -Piña	50-60 °C @ pH 5.0 3,0-9,0	Enzyme Development Corp.
Papain 6000 L	Proteasa -hidrolasa - endopeptidasa	Planta -Papaya	65-80°C pH 5,0-7,0	Valley Research
Validase <sup>®</sup> FPII	Proteasa -hidrolasa - exopeptidasa	Microbiana - Fúngica - <i>Aspergillus oryzae</i>	50-60 °C pH 5,0-8,0	Valley Research
Corolase <sup>®</sup> LAP	Proteasa - exopeptidasa pura	Microbiana - <i>Aspergillus sojae</i>	< 70°C pH 6,0-9,0	AB Enzymes

El hidrolizado de gelatina obtenido en este ejemplo se usó como hidrolizado de Tipo LSH en los ejemplos siguientes. Se determinó que el peso molecular medio era de aproximadamente 1.500 Da.

5 **Ejemplo 2**

Se usó el procedimiento siguiente para cuantificar el grado de reducción de la reticulación para varias composiciones de gelatina. En los experimentos de control, se añadieron 10,0 ± 0,1 g de una gelatina a un vaso de precipitados de 250 ml, al cual se añadieron 90,0 ± 0,5 g de agua desionizada. Se colocó un vidrio de reloj sobre el vaso de precipitados y la gelatina se dejó hinchar durante 30-60 minutos. La gelatina hinchada se colocó en un baño de agua a 60 ± 0,1 °C durante 15-30 minutos o hasta que se disolvió toda la gelatina. Se colocó una barra de agitación magnética en la solución de gelatina y el pH se ajustó en una placa de agitación con NaOH o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido a un pH de 7,00 ± 0,05, después de lo cual se retiró la barra de agitación magnética. La solución se colocó en un baño de agua 40 ± 0,1 °C durante 15-60 minutos para enfriarla. Se usó un motor digital de agitación (Heidolph Brinkman 2102) equipado con un mezclador de 4-palas para crear un vórtice a 750 ± 10 RPM. Inmediatamente, se añadieron 20 ± 0,5 ml de una solución de formalina al 10% tamponada con fosfato pH 7 (Fisher Scientific). El tiempo de endurecimiento vorticial se registró (en segundos) como el tiempo en el que la solución de gelatina reticulada se colapsó sobre el eje del mezclador de 4 palas.

En experimentos que implican composiciones de gelatina que contienen aditivos, un porcentaje de la gelatina fue sustituido con el aditivo deseado (por ejemplo, una muestra con un 10% de hidrolizado añadido contenía 9,0 g de gelatina y 1,0 g de hidrolizado). Se cree que las gelatinas que muestran un mayor tiempo de endurecimiento vorticial tienen una menor tendencia hacia la reticulación inducida por formaldehído.

Tal como se muestra en la Tabla 2, el ensayo de endurecimiento vorticial confirma los hallazgos anteriores de que la combinación de glicina y ácido cítrico puede reducir la cantidad de reticulación de gelatina. De manera más importante, la adición de glicina sola tiene un efecto dramático sobre el tiempo de endurecimiento vorticial de esta muestra de gelatina de hueso encalado particular. La adición de citrato no redujo la reticulación. Curiosamente, la adición de 1,5% de citrato promovió la reticulación en esta muestra particular. Estos resultados pueden servir para reforzar la posición del papel de la glicina como un eliminador de aldehído en este sistema modelo. Los efectos perjudiciales sobre la reticulación, experimentados por una de las muestras que contenían sólo citrato, no pueden explicarse fácilmente.

El ensayo de endurecimiento vorticial se usa en la presente memoria como una herramienta analítica para una rápida detección de los efectos de los aditivos sobre el comportamiento de reticulación de las composiciones de gelatina.

Tabla 2

Muestra	Nº de muestras	Endurecimiento vorticial medio (seg.)	Desv. Est. Rel.
Gelatina de hueso encalado de alta consistencia	21	221,07	3,93%

(Cont.)

1,5% de glicina	6	292,46	4,67%
2,5% de glicina	6	342,69	3,43%
0,5% de citrato	6	218,11	4,21%
1,5% de citrato	6	177,88	3,97%
2,5% de glicina y 0,5% de citrato	6	346,33	9,63%

5 La Figura 1 detalla los efectos de añadir hidrolizado de Tipo LSH, un hidrolizado de gelatina de piel encalada obtenida en un procedimiento similar al del Ejemplo 1 (PM ~ 1.200 Da) y un hidrolizado de gelatina de Tipo BH- 3 (PM ~ 2.200 Da) a LH- 1, una gelatina de piel encalada con una consistencia de 260 g y una viscosidad al 6.67% de 45 mP. La expresión viscosidad al 6,67% se usa como una abreviatura de una viscosidad observada con una solución CDG al 6,67% en agua. Los resultados muestran un aumento en el tiempo de endurecimiento vorticial para ambos hidrolizados añadidos. Sin embargo, el rendimiento fue mejor después de la adición del hidrolizado de la presente invención, Tipo LSH. Varias gelatinas de piel exhibieron esta reticulación muy rápida que anteriormente sólo se había observado en las gelatinas de hueso encalado con una viscosidad al 6.67% cercana a 60 mP.

10 La Tabla 3 muestra el tiempo de endurecimiento vorticial de varias gelatinas de piel encalada en relación a las diferentes propiedades de peso molecular. No pudieron deducirse tendencias concluyentes con las excepciones de una posible correlación de un mayor porcentaje de microgel y viscosidad con una mayor reticulación y una subsiguiente reducción en el tiempo de endurecimiento vorticial.

15

Tabla 3

Muestra	Endurecimiento vorticial (seg)	Consistencia/vis (mP)	PM (Da)	MN (DA)	MZ (DA)	MZ+1 (DA)	Polidispersidad	% microgel
LH-1	8,30	260/45	213.904	52.949	600.246	851.367	4,0398	17,41
LH-2	8,70	229/44	225.257	50.655	629.993	880.268	4,446	18,76
LH-3	8,99	264/48	225.013	61.969	592.328	847.234	3,6311	18,80
LH-4	9,33	240/33	206.317	46.151	620.740	887.725	4,4705	16,46
LH-5	10,85	260/52	232.321	63.612	600.657	852.871	3,6522	18,58
LH-6	34,18	247/48	232.608	63.148	599.777	852.031	3,6836	17,73
LH-7	47,31	263/42	232.384	55.568	635.932	888.496	4,1827	20,00
LH-8	55,49	276/46	247.005	60.234	653.816	897.853	4,1157	22,51
LH-9	186,51	151/40	184.474	45.503	526.119	780.369	4,0541	12,76
LH-10	208,14	239/36	202.601	49.094	579.370	826.045	4,1268	16,28
LH-11	315,30	222/32	175.773	45.076	520.956	779.246	3,8232	12,363

20 La Tabla 4 muestra los resultados de añadir 10% de hidrolizado de Tipo LBSH del Ejemplo 1 (PM medio = 1.500), un hidrolizado de gelatina de Tipo BB-4 y glicina a una gelatina de hueso encalado de alta viscosidad con una consistencia de 240 g y una viscosidad al 6,67% de 64 mP. Este extracto de alta viscosidad exhibe propiedades de reticulación similares a algunas gelatinas de piel encalada con una viscosidad mucho más baja. Esta gelatina mostró una reducción significativa en la reticulación en presencia de los tres aditivos. Sin embargo, el hidrolizado de Tipo LBSH aumentó el tiempo de endurecimiento vorticial en casi un 30% en comparación con el Tipo BB-4. La glicina mostró la mayor reducción en la reticulación y el subsiguiente aumento en el tiempo de endurecimiento vorticial, tal como se muestra en

la Tabla 4.

Tabla 4

Muestra	Endurecimiento vorticial medio (seg)	Desv. Est. Relativa
Control hueso encalado de alta viscosidad	28,8	40,1%
Control con 10% de Tipo LBSH	242,6	5,1%
Control con 10% de Tipo BB-4	187,7	5,1%
Control con 10% de Glicina	>480	N/A

5 La Tabla 5 muestra los resultados de un experimento que trata de determinar la cantidad de hidrolizado de bajo peso molecular necesaria para igualar el rendimiento de glicina cuando se añade a una gelatina farmacéutica de hueso encalado de viscosidad media (consistencia = 244, viscosidad al 6,67% = 47,0 mP) según se mide mediante el ensayo de endurecimiento vorticial. Los resultados indican que el 4-5% de Tipo LBSH es necesario para igualar el rendimiento de 2,5% de glicina, mientras que se necesita 5-6% de Tipo BB-4. De manera similar, se necesita el 10% de Tipo LBSH y el 11-12% de Tipo BB-4 para igualar la reducción en la reticulación conseguida con el 5,0% de glicina.

10

Tabla 5

Muestra	Endurecimiento vorticial medio (seg)	Desv. Est. Relativa
Control hueso encalado de viscosidad media	192,5	11,1%
Con 2,5% de glicina	307,8	3,1%
Con 5% de glicina	506,5	3,9%
Con 4,0% de Tipo LBSH	281,5	2,1%
Con 5% de Tipo LBSH	356,7	2,7%
Con 7,5% de Tipo LBSH	395,9	3,7%
Con 10% de Tipo LBSH	492,2	4,0%
Con 5% de Tipo BB-4	295,8	3,1%
Con 6% de Tipo BB-4	323,7	0,4%
Con 7,5% de Tipo BB-4	339,6	0,2%
Con 10,0% de Tipo BB-4	434,0	2,4%
Con 11,0% de Tipo BB-4	483,6	3,6%
Con 12,0% de Tipo BB-4	519,9	3,7%

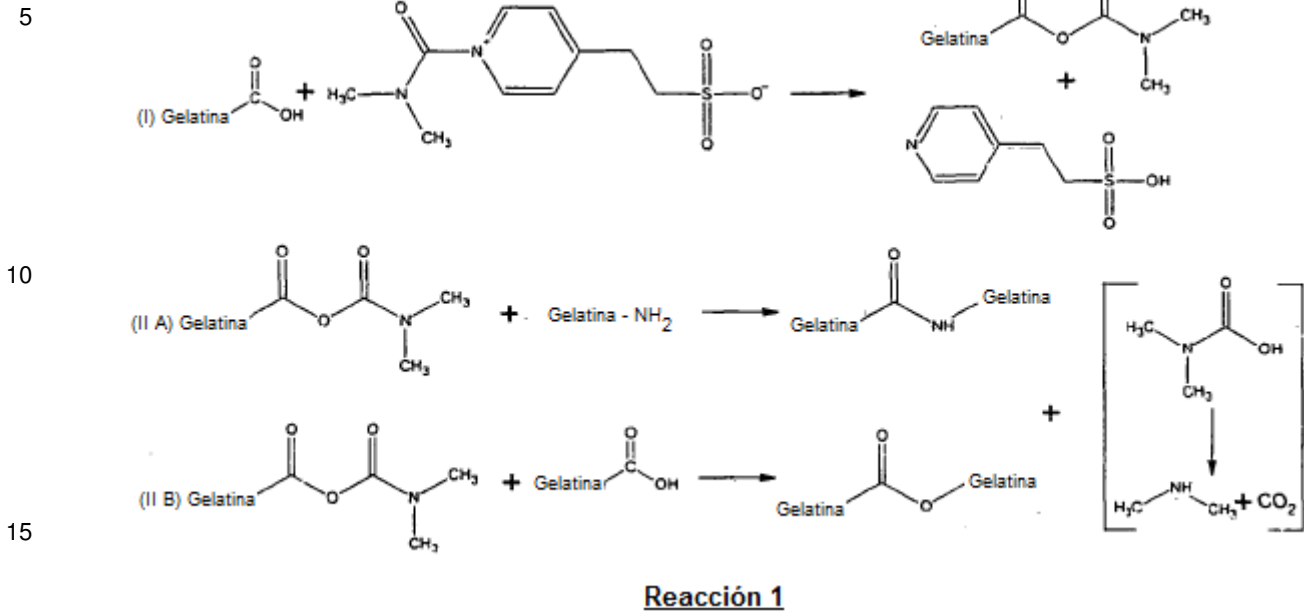
### Ejemplo 3

El agente de endurecimiento de gelatina OB1207<sup>®</sup> [2-(4-dimetilcarbamoil-piridino)-etano-1-sulfonato] fue adquirido de HW Sands Corporation. OB1207<sup>®</sup> ha sido promocionado como un reemplazo para el formaldehído en emulsiones fotográficas. La reacción 1 describe la reticulación de OB1207<sup>®</sup> con gelatina. La formación de enlaces amida y éster

15



entre las cadenas de gelatina a través de la reacción con OB1207<sup>®</sup> puede imitar estrechamente el tipo de reticulación observado en las muestras de gelatina que han sido envejecidas y/o sometidas a estrés debido a su exposición a condiciones extremas de calor y humedad.



20

25

En los experimentos de control, se añadieron  $15,0 \pm 0,1$  g de gelatina (gelatina de hueso encalado de Tipo B, consistencia = 200) a un matraz de 250 ml. A esto, se añadieron  $95,0 \pm 0,5$  g de agua desionizada y una barra de agitación magnética. La gelatina se cubrió con Parafilm, se permitió que se hinchara durante 30-60 minutos. El matraz se colocó en un baño de agua a  $60 \pm 1,0^\circ\text{C}$  durante 15-20 minutos o hasta que se disolvió toda la gelatina. La viscosidad de esta solución se midió usando un viscosímetro Brookfield DV-III + reómetro a 50 rpm y  $60,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Una solución de 0,30 g de OB1207<sup>®</sup> disuelto en 10,0 g de agua desionizada se añadió lentamente a la gelatina en el matraz con agitación sobre una placa de agitación. El matraz se colocó de nuevo en el baño de agua. La viscosidad de la solución se midió 2 horas más tarde. En experimentos que contenían la adición de hidrolizados, un porcentaje de la gelatina de control fue sustituido con el hidrolizado deseado (es decir, una muestra con 10% de hidrolizado añadido contenía 13,5 g de gelatina y 1,5 g de hidrolizado).

30

35

Los resultados de los experimentos de viscosidad que implican una consistencia y una viscosidad medias de la gelatina (LB-1) después de la reticulación con OB1207<sup>®</sup> se proporcionan en la Tabla 6. El control A LB-1 no tenía ningún hidrolizado u OB1207<sup>®</sup> añadido, mientras que el control B LB-1 no tenía ningún hidrolizado, pero fue reticulado con OB1207<sup>®</sup>. Después de dos horas, el control B era demasiado viscoso para obtener una lectura en el reómetro Brookfield, lo que indica un grado muy alto de reticulación. Las muestras que contenían hidrolizados mostraron un menor grado de reticulación, siendo los mejores resultados los obtenidos con el Tipo LBSH, el hidrolizado de la presente invención, especialmente en el nivel del 10%.

Tabla 6

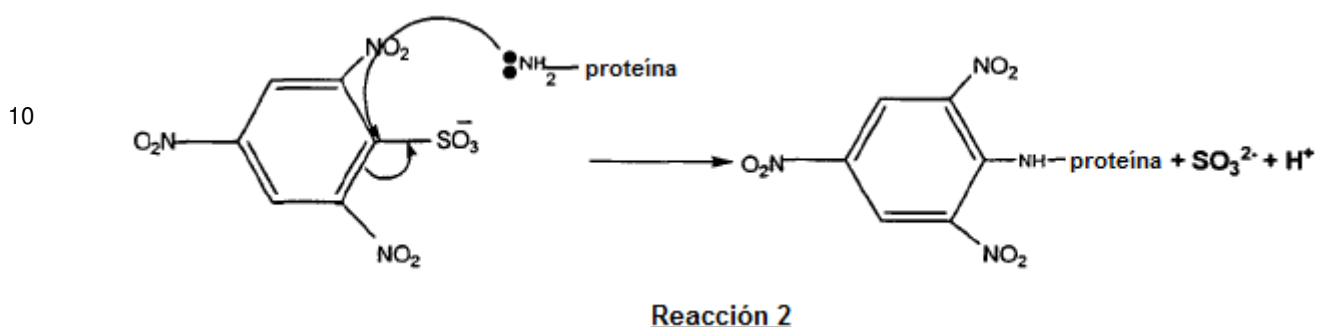
Muestra	Vis. Inicial media (cP)	Vis. Final media (cP)
Control A LB-1	16,2	16,5
Control B LB-1 (sin aditivos)	15,9	73,5
Con 5% de Tipo LBSH	13,2	48,6
Con 5% de Tipo BB-4	13,2	53,2

(Cont.)

Con 5% de Tipo BB-1a	14,4	69,0
Con 5% de Tipo BB-1b	13,2	62,4
Con 10% de Tipo LBSH	12	31,2
Con 10% de Tipo BB-4	11,2	39,8
Con 10% de Tipo BB-1a	12,6	57,4
Con 10% de Tipo BB-1b	12	46,8

**Ejemplo 4**

5 Se usó el procedimiento siguiente para determinar el contenido de aminas primarias en el hidrolizado de gelatina. El uso de ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) para medir la cantidad de aminas primarias fue descrito por Alder-Nissen (6). Se usó una versión modificada de este procedimiento para medir las cantidades relativas de aminas primarias en los hidrolizados de gelatina. La reacción 2 describe la derivación de una amina primaria con TNBS.

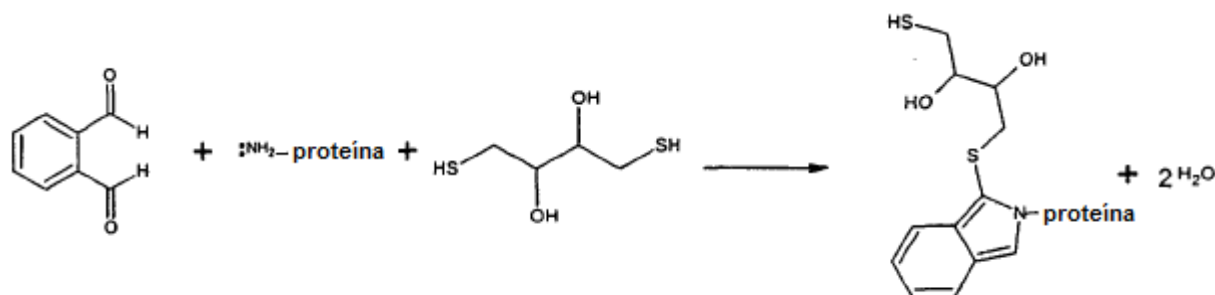


15 Se añadió glicina (Acros) en la cantidad de  $2.000 \pm 0.002$  g a un vaso de precipitados de 250 ml y se llevó hasta un peso de  $200,00 \pm 0,01$  g usando una solución al 1% de dodecil sulfato de sodio ("SDS", Aldrich) (solución de glicina a la que se hace referencia ahora como G-1). Se añadieron hidrolizados de gelatina en la cantidad de  $4,000 \pm 0,002$  g a vasos de precipitados de 250 ml y se llevaron hasta un peso de  $100 \pm 0,01$  g usando la solución de SDS al 1% (solución de hidrolizado a la que se hace referencia ahora como H-1). Los vasos de precipitados que contenían las soluciones G-1 y H-1 se colocaron en una placa calefactora y se calentaron a una temperatura de  $80-85^{\circ}\text{C}$  para disolver y dispersar completamente los sólidos. Las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente y, a continuación, se añadió 1,00 g de G-1 a un vaso de precipitados de 250 ml y se llevó hasta un peso de  $200,00 \pm 0,01$  g usando la solución de SDS al 1% (G-2). Se realizaron diluciones (estándares G-3) de G-2 en 50 ml de matraces aforados mediante la adición de 50, 37,5, 25, 12,5, 5 y 0,5 ml de G-2, respectivamente. Los matraces fueron llevados hasta la marca usando la solución de SDS al 1%. La solución H-1 se diluyó para crear H-2 mediante la adición de 1,00 g de H-1 y se llevó hasta un peso de  $200,00 \pm 0,01$  g en un vaso de precipitados de 250 ml usando la solución de SDS al 1%. A un tubo de ensayo de 15 ml se añadieron 2 ml de un tampón de fosfato 0,2125 M (preparado añadiendo  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2125 M a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2125 M hasta que se alcanzó un pH de  $8,20 \pm 0,02$ ), y 250  $\mu\text{l}$  de los estándares G-3. Esto corresponde a una calibración de seis glicinas estándar que contenían 0,1667, 0,1250, 0,0833, 0,0417, 0,0167 y 0,0017  $\mu\text{moles}$  de aminas primarias por muestra, respectivamente. De manera similar, se añadieron 250  $\mu\text{l}$  de cada solución de H-2 a un tubo de ensayo de 15 ml (correspondiente a 50  $\mu\text{g}$  de muestra) junto con 2 ml de tampón de fosfato. Se preparó una muestra de control añadiendo 250  $\mu\text{l}$  de la solución de SDS al 1% a un tubo de ensayo de 15 ml con 2 ml de tampón. Se preparó una solución de trinitrobenzeno al 0,1% añadiendo  $170 \pm 2$   $\mu\text{l}$  de una solución TNBS 1M (Sigma) a un matraz aforado de 50 ml y se llevó hasta la marca con agua desionizada y se cubrió inmediatamente con papel de aluminio, ya que el TNBS es fotosensible.

35 La totalidad de las etapas siguientes se realizaron en un cuarto oscuro fotográfico. A los tubos de ensayo, se añadieron 2 ml de la solución de TNBS al 1%. A continuación, los tubos de ensayo se agitaron en vórtex (Fisher Scientific Vortex Genie 2) durante 5 segundos. A continuación, las muestras se colocaron en un baño de agua a  $50,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. A continuación, las muestras se agitaron en vórtex, durante 5 segundos adicionales y se colocaron de nuevo en el baño de agua durante 30 minutos. Las muestras se retiraron del baño de agua y se añadieron 4 ml de una

solución de HCl 0,100 N para terminar la reacción de TNBS. Las soluciones se agitaron en vórtex durante 5 segundos y se dejaron enfriar durante 10 minutos (un enfriamiento más prolongado puede conducir a la turbidez debido al SDS). Se tomaron lecturas de la absorbancia de cada una de las muestras a 340 nm (espectrofotómetro Beckman DU-7) contra un blanco de agua. Las cantidades de aminas primarias en las muestras se calcularon usando un cálculo de regresión lineal basado en la absorbancia de los estándares de glicina.

La derivación de aminas primarias con o-ftaldialdehído (OPA) para medir la proteólisis en proteínas de la leche fue descrita por Church et al (7). Nielsen et al (8) usa OPA para medir el grado de hidrólisis en otras proteínas de los alimentos, incluyendo la de la gelatina. Una ventaja del procedimiento de Nielsen es la sustitución del ditioneol (DTT - reactivo de Cleland) más respetuoso con el medio ambiente para el  $\beta$ -mercaptoetanol como agente reductor que contiene azufre. Este procedimiento es una adaptación del trabajo de Nielsen et al. La Reacción 3 representa la reacción de aminas primarias con OPA en presencia de DTT.



**Reacción 3**

El reactivo OPA fue preparado añadiendo 7,620 g de decahidrato de tetraborato de sodio (Fisher Scientific) y 200 mg de SDS a un matraz aforado de 200 ml. Se añadió agua desionizada en la cantidad de aproximadamente 150 ml a la solución y se agitó hasta que se disolvió por completo. Se disolvió OPA (Aldrich) en la cantidad de 160 mg en 4 ml de etanol (Fisher Scientific) y se transfirió cuantitativamente al matraz aforado con agua desionizada. Se añadió DTT (Aldrich) en la cantidad de 176 mg y se aumentó el volumen de toda la solución con agua desionizada. Se crearon estándares de glicina añadiendo 50 mg de glicina a un matraz aforado de 500 ml y llenando hasta la marca con agua desionizada. Se realizaron diluciones añadiendo 100, 75, 50, 25 y 5 ml de la solución de glicina a matraces aforados de 100 ml y llenando hasta la marca con agua desionizada, creando 5 estándares de glicina. Se prepararon muestras de hidrolizado de gelatina añadiendo 0,500 g de hidrolizado a un matraz aforado de 100 ml y añadiendo agua desionizada hasta la marca. A otro matraz aforado de 100 ml, se añadieron 10 ml de la solución de hidrolizado y se llenó hasta la marca con agua desionizada. A un tubo de ensayo de 15 ml, se añadieron 3,0 ml de la solución de reactivo OPA seguido por 400  $\mu$ l de un estándar de glicina (resultando en 40, 30, 20, 10 y 2  $\mu$ g de glicina) o una muestra de hidrolizado de gelatina (200  $\mu$ g de hidrolizado). También se usó una muestra de control usando 400  $\mu$ l de agua para medir la absorbancia de OPA individualmente. La muestra se sometió a vórtice durante 5 segundos. Se tomaron lecturas de la absorbancia exactamente 2 minutos después de la adición de la muestra contra un blanco de agua. La desviación con respecto a la exigencia de 2 minutos tiene un impacto considerable sobre la absorbancia. A continuación, cada muestra o estándar se ensayó en intervalos de dos minutos. Las cantidades de aminas primarias en las muestras se calcularon usando un cálculo de regresión lineal basado en la absorbancia de los estándares de glicina.

La Tabla 7 y la Tabla 8 muestran los resultados de la derivación TNBS y OPA de aminas primarias en 6 hidrolizados de gelatina, un primer extracto de gelatina, un trímero de glicina y un monómero de lisina. El grado de hidrólisis se expresa como la cantidad de aminas primarias, dividida por el número de aminas primarias en la muestra hidrolizada de HCl (HCl 6N durante 24 horas @ 110°C). Los pesos moleculares derivados de TNBS y OPA son la inversa de la cantidad de aminas primarias por cantidad de muestra. Se considera que los pesos moleculares derivados de TNBS y OPA son sólo cualitativos, siendo el significado verdadero la cantidad medida de aminas primarias en cada una de las muestras. Los pesos moleculares derivados de la amina primaria no tienen en cuenta la doble derivación de lisina e hidroxilisina, ni el hecho de que las aminas secundarias no se derivan mediante ninguno de los agentes de derivación. Sin embargo, suponiendo que estos factores son relativamente constantes para todos los hidrolizados de gelatina, el peso molecular derivado de la amina primaria es un medio útil para comparar los grados relativos de hidrólisis entre los diferentes tipos de hidrolizados de gelatina. Los hidrolizados de Tipo LBSH y Tipo LSH, de huesos y de piel encalados, según la presente invención, mostraron un aumento medio de casi el 30-130% de aminas primarias sobre otros hidrolizados digeridos enzimáticamente. También se proporciona el peso molecular medio medido mediante la metodología SEC/HPLC. Obsérvese que los pesos moleculares para la lisina y el trímero de glicina están lejos de los valores de peso molecular conocidos. Los pesos moleculares derivados de TNBS y OPA son también muy similares a los resultados esperados de la muestra de gelatina hidrolizada HCl, mientras que los datos HPLC/SEC son casi 5 veces

esta cantidad. Esto demuestra la imprecisión relativa de la metodología SEC/HPLC de bajo peso molecular usada generalmente para medir el peso molecular de los hidrolizados de gelatina. Los pesos moleculares derivados de TNBS y OPA no se consideran para la gelatina. Las complejidades de la macromolécula de gelatina inhiben una descripción exacta del peso molecular usando este modelo simplificado. La derivación con OPA resulta ser un medio mucho más fiable para medir el contenido de aminas primarias en comparación con la derivación con TNBS.

5

Tabla 7

Muestra	Aminas primarias μMol media/μg		Desv. Est. Relativa		Grado de hidrólisis		Peso molecular medio derivado (Da)		
	TNBS	OPA	TNBS	OPA	TNBS	OPA	TNBS	OPA	SEC
Tipo LBSH	1,05E-03	1,10E-03	11,7%	2,8%	14,1%	14,5%	952	911	~1.800
Tipo LSHH	1,02E-03	1,07E-03	13,7%	1,3%	13,7%	14,1%	980	936	---
Tipo BB-4	7,52E-04	8,56E-04	18,6%	2,6%	10,1%	11,3%	1.330	1.169	~1.900
Tipo BB-1a	4,53E-04	4,91E-04	46,8%	2,4%	6,1%	6,5%	2.209	2.035	~3.000
Tipo BB-1b	5,26E-04	5,54E-04	30,8%	2,0%	7,1%	7,3%	1.902	1.805	~3.500
Gelatina	2,31E-04	3,39E-04	2,3%	1,0%	3,1%	4,5%	---	---	---
Hidrolizado HCl	7,43E-03	7,57E-03	5,3%	0,7%	100,0%	100,0%	135	132	~750
Gly-Gly-Gly	3,66E-03	4,98E-03	13,3%	0,7%	---	---	273	201	~800
Lisina	6,43E-03	5,85E-03	10,1%	0,7%	---	---	156	171	~900

Tabla 8

Muestra	Relación de aminas primarias comparada con hidrolizado de HCl		Relación de aminas primarias comparada con Tipo LBSH		Relación de aminas primarias comparada con gelatina	
	TNBS	OPA	TNBS	OPA	TNBS	OPA
Tipo LBSH	0,14	0,14	1,00	1,00	4,56	3,24
Tipo LSHH	0,14	0,14	0,97	0,97	4,43	3,15
Tipo BB-4	0,10	0,11	0,72	0,78	3,26	2,52
Tipo BB-1a	0,06	0,06	0,43	0,45	1,96	1,45
Tipo BB-1b	0,07	0,07	0,50	0,50	2,28	1,63
Gelatina	0,03	0,04	0,22	0,31	1,00	1,00
Hidrolizado HCl	1,00	1,00	7,08	6,90	32,24	22,34

10 Referencias

Todas las referencias citadas en el texto anterior de la solicitud de patente o en la lista de referencias siguiente, en la medida en que proporcionan detalles ejemplares, de procedimiento u otros detalles suplementarios a los expuestos en la presente memoria, se incorporan específicamente por referencia como si se indicara específica e individualmente que cada publicación o solicitud de patente individual fuera incorporada por referencia.

- 15 1. Ofner, C.M., Zhang, Y., Jobeck, V., Bowman, B., "Crosslinking Studies in Gelatin Capsules Treated with Formaldehyde and in Capsules Exposed to Elevated Temperature and Humidity". J. Pharm. Sci., Jan. 2001, 90(1): 79-

88.

2. Singh, S., Rama Rao, K.V., Venugopal, K. Manikandan, R., "Dissolution Characteristics: A Review of the Problem, Test Methods, and Solutions". *Pharmaceutical Technology*. Abril 2002; 36-58.
- 5 3. Adesunloye, T.A., Stach, P.E., "Effect of Glycine/Citric Acid on the Dissolution Stability of Hard Gelatin Capsules". *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1998, 24(6), 493-500.
4. Rama Rao, K.V., Pakhale, S.P., Singh, S., "A film Approach for the Stabilization of Gelatin Preparations Against Cross-Linking". *Pharmaceutical Technology*. Abril 2003: 54-63.
5. Fraenkel-Conrat, H., Olcott, H., "Reaction of Formaldehyde with Proteins. II. Participation of Guanidyl Groups and Evidence of Crosslinking". *J. Am. Chem. Soc.*, Enero 1946, 68(1): 34-37.
- 10 6. Adler-Nissen, J., "Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzene Sulfonic Acid", *J. Agric. Food Chem.*, Nov.-Dic.1979, 27(6): 1256-62.
7. Church, F., et al, "Spectrophotometric Assay Using o-phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins". *J. of Dairy Sci.*, 1983, 66(6): 1219-1227.
- 15 8. Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C., "Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis". *J. of Food Sci.*, 2001, 66(5): 642-646.
9. Fraenkel-Conrat, H., Cooper, M., Olcott, H., "The Reaction of Formaldehyde with Proteins". *J. Am. Chem. Soc.*, Jun. 1945, 67(6): 950-954.
10. Fraenkel-Conrat, H., Olcott, H., "The Reaction of Formaldehyde with Proteins V. Cross linking between Amino and Primary Amide or Guanidyl Groups". *J. Am. Chem. Soc.*, Agosto 1948, 70(8): 2673-2684.
- 20 11. Ward, A. G., Courts, A., *The Science and Technology of Gelatin*. Academic Press Inc.1977, pp. 231.
12. Davis, P., Tabor, B., "Kinetic Study of the Crosslinking of Gelatin by Formaldehyde and Glyoxal". *J. Polym. Sci. Part A.*, 1963, 1: 799-815.
13. Albert, K., Peters, B., Bayer, E., Treiber, U., Zwilling, M., "Crosslinking of Gelatin with Formaldehyde; a <sup>13</sup>C NMR Study". *Z. Naturforsch.*, 1986, 41b: 351-358
- 25 14. Gold, T.B., et al., "Studies on the Influence of pH and Pancreatin on <sup>13</sup>C-Formaldehyde-Induced Gelatin Cross-Links Using Nuclear Magnetic Resonance". *Pharm. Dev. Tech.*, 1996, 1(1): 21-26.
15. Matsuda, S., Iwata, H., Se, N., Ikada, Y., "Bioadhesion of Gelatin Films Crosslinked with Glutaraldehyde". *J Biomed Mater. Res.* Abril. 1999; 45(1):20-7.
- 30 16. Jiskoot, W., et al., "Identification of Formaldehyde-induced Modifications in Proteins: Reaction with Model Peptides". *J. Bio. Chem.*, Febrero 2004, 279(8): 6235-6243.
17. Digenis, G.A., Gold, T.B., Shah, V.P., "Cross-Linking of Gelatin Capsules and its Relevance to Their in Vitro-in Vivo Performance". *J. Pharm. Sci.*, Julio 1994, 83(7):915-921.
18. Nagaraj, R.H., Shipanova, I.N., Faust, F.M., "Protein Cross-Linking by the Maillard Reaction". *J. Biol. Chem.*, Agosto 1996, 271(32):19338-19345.
- 35 19. "Enzymic Hydrolysis of Food Proteins"; Elsevier Applied Science Publishers Ltd. (1986), página 122.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de fabricación de un hidrolizado de gelatina, en el que el hidrolizado de gelatina tiene un peso molecular medio de 100 a 2.000 Da y un contenido medio de amina primaria de  $1,0 \times 10^{-3}$  a aproximadamente  $1,0 \times 10^{-2}$   $\mu\text{Mol}$  de amina primaria por  $\mu\text{g}$  de hidrolizado de gelatina, que comprende el procedimiento:
  - 5 (a) en primer lugar, poner en contacto un material de partida de gelatina con al menos una enzima proteolítica que tiene actividad endopeptidasa para formar un producto de gelatina digerido con endopeptidasa, y
  - (b) a continuación, poner en contacto el producto de gelatina digerido con endopeptidasa con al menos una enzima proteolítica que tiene actividad exopeptidasa para formar el hidrolizado de gelatina.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las enzimas proteolíticas son enzimas de calidad alimentaria que tienen actividad endopeptidasa o exopeptidasa a un pH de entre 5 y 7 y a una temperatura entre 40°C y 65°C.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que las enzimas proteolíticas se seleccionan de entre el grupo que consiste en endopeptidasa de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, Corolase<sup>®</sup> 7089), bromelaína (por ejemplo Enzeco<sup>®</sup> Bromelain Concentrate), papaína (por ejemplo, Papain 6000L), exopeptidasa de *Aspergillus oryzae* (por ejemplo Validase<sup>®</sup> FPII) y exopeptidasa de *Aspergillus sojae* (por ejemplo Corolase<sup>®</sup> LAP).
- 15 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que del 0,025% al 0,15% (p/p) de la enzima proteolítica que tiene actividad endopeptidasa proteolítica se pone en contacto con el material de partida de gelatina y del 0,025% al 0,15% (p/p) de la enzima proteolítica que tiene actividad exopeptidasa se pone en contacto con el producto de gelatina digerido con endopeptidasa.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el procedimiento comprende:
  - 20 (a) poner en contacto un material de partida de gelatina con una serie de al menos tres enzimas proteolíticas que tienen actividad endopeptidasa para formar un producto de gelatina digerido con endopeptidasa, en el que las tres enzimas proteolíticas consisten en endopeptidasa de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, Corolase<sup>®</sup> 7089), bromelaína (por ejemplo, Enzeco<sup>®</sup> Bromelain Concentrate) y papaína (por ejemplo, Papain 6000L); y
  - 25 (b) poner en contacto el producto de gelatina digerido con endopeptidasa con una serie de al menos dos enzimas proteolíticas que tienen actividad exopeptidasa, en el que las dos enzimas proteolíticas consisten en exopeptidasa de *Aspergillus oryzae* (por ejemplo Validase<sup>®</sup> FPII) y exopeptidasa de *Aspergillus sojae* (por ejemplo, Corolase<sup>®</sup> LAP).
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que cada enzima proteolítica se añade secuencialmente al material de partida de gelatina en el orden siguiente: endopeptidasa de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, Corolase<sup>®</sup> 7089), bromelaína (por ejemplo Enzeco<sup>®</sup> Bromelain Concentrate), papaína (por ejemplo, Papain 6000L), exopeptidasa de *Aspergillus oryzae* (por ejemplo Validase<sup>®</sup> FPII) y exopeptidasa de *Aspergillus sojae* (por ejemplo, Corolase<sup>®</sup> LAP); y en el que cada enzima proteolítica digiere el material de partida de gelatina durante 0,5 a 2 horas antes de la adición de la subsiguiente enzima proteolítica.
- 30 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se permite que la digestión proteolítica proceda durante 5 a 12 horas.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el material de partida de gelatina tiene una consistencia de menos de 150 y una viscosidad de menos de 30 mP a 60°C y a una concentración de gelatina del 6,67% en peso.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que una solución acuosa que contiene del 10% al 50% (p/p) del material de partida de gelatina se pone en contacto con las enzimas proteolíticas.
- 40 10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el material de partida de gelatina es una gelatina de calidad farmacéutica.
11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que se añaden del 0,05% al 0,15% (p/p) de Corolase<sup>®</sup> 7089, del 0,025% al 0,075% (p/p) de Enzeco<sup>®</sup> Bromelain Concentrate, del 0,05% al 0,15% (p/p) de Papain 6000L, del 0,025% al 0,075% (p/p) de Validase<sup>®</sup> FPII y del 0,05% al 0,15% (p/p) de Corolase<sup>®</sup> LAP al material de partida de gelatina.
- 45 12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que las digestiones proteolíticas se llevan a cabo a un pH de 5 a 7 y a una temperatura de 40°C a 65°C.
13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el peso molecular medio del

hidrolizado de gelatina está comprendido en el intervalo de 100 a 1.500 Da.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el peso molecular medio del hidrolizado de gelatina está comprendido en el intervalo de 400 a 1.200 Da, más preferiblemente de 700 a 1.200 Da.

5 15. Un hidrolizado de gelatina obtenido mediante el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que tiene un peso molecular medio de 100 a 2.000 Da y un contenido de amina primaria medio de  $1,0 \times 10^{-3}$  a  $1,0 \times 10^{-2}$   $\mu$ moles de amina primaria por  $\mu$ g de hidrolizado de gelatina.

16. Hidrolizado de gelatina según la reivindicación 15, en el que el hidrolizado de gelatina tiene un grado de hidrólisis superior al 13%.

10 17. Hidrolizado de gelatina según la reivindicación 15 o 16, en el que el peso molecular medio del hidrolizado de gelatina está comprendido en el intervalo de 100 a 1.500 Da.

18. Hidrolizado de gelatina según la reivindicación 17, en el que el peso molecular medio es de 400 a 1.200 Da, más preferiblemente de 700 a 1.200 Da.

19. Hidrolizado de gelatina según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que el polipéptido medio en el hidrolizado de gelatina es de 4 a 18 aminoácidos de longitud.

15 20. Una composición de gelatina que comprende del 1% al 20% en peso del hidrolizado de gelatina según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, y del 80% al 99% en peso de gelatina.

21. Composición de gelatina según la reivindicación 20, en la que la composición comprende del 5% al 10% en peso del hidrolizado de gelatina y del 90% al 95% en peso de gelatina.

20 22. Composición de gelatina según la reivindicación 20, en la que la composición comprende una proporción de hidrolizado de gelatina a gelatina comprendida entre 1:4 y 1:99 (p/p).

23. Composición de gelatina según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en la que la gelatina tiene un peso molecular medio superior a 150.000 Da.

24. Composición de gelatina según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en la que la gelatina tiene un peso molecular medio de 100.000 a 150.000.

25 25. Composición de gelatina según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, en la que la gelatina es una gelatina de calidad farmacéutica.

26. Composición de gelatina según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25, en la que la gelatina es gelatina de Tipo B.

30 27. Composición de gelatina según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25, en la que la gelatina es gelatina de Tipo A.

28. Composición de gelatina según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 27, en la que el hidrolizado de gelatina tiene un peso molecular medio de 100 a 1.500 Da, preferiblemente de 400 a 1.200 Da, más preferiblemente de 700 a 1.200 Da.

29. Composición de gelatina según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 28, que comprende además glicina.

35 30. Composición de gelatina según la reivindicación 29, en la que la cantidad de glicina es del 0,5% al 5% en peso.

31. Composición de gelatina según la reivindicación 29 o 30, que comprende además ácido cítrico.

32. Composición de gelatina según la reivindicación 31, en la que la cantidad de ácido cítrico es del 0,5% al 5% en peso.

40 33. Composición de gelatina según la reivindicación 29, en la que la cantidad de glicina añadida es del 1,5% al 2,5% en peso y la cantidad de citrato añadido es del 0,5% al 1,5% en peso.

34. Composición de gelatina según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en la que la composición tiene un tiempo de endurecimiento vorticial de 200 a 300 segundos.

35. Composición de gelatina según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 33, en el que la composición tiene un tiempo de endurecimiento vorticial mayor de 300 segundos.

36. Composición de gelatina según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 35, en la que la composición tiene una viscosidad media de 10 a 15 cP y en la que después de la adición del 0,5% en peso de [2-(4-dimetilcarbamoil-piridino)-etano-1-sulfonato] a la composición y hacer reaccionar la misma durante dos horas a una temperatura de reacción de aproximadamente 60°C, la composición tiene una viscosidad media de 15 a 50 cP.
- 5 37. Uso de una composición de gelatina según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 36 en la fabricación de cápsulas de gelatina duras o blandas.



Figura 1

