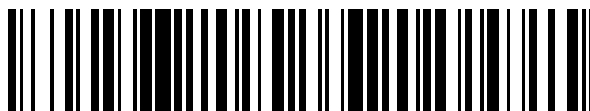


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 402**

51 Int. Cl.:

A23L 1/305 (2006.01)
A23J 1/20 (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61K 35/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2008 E 08845996 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2210507**

54 Título: **Composiciones para fortalecer los huesos**

30 Prioridad:

01.11.2007 JP 2007285377

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

06.10.2015

73 Titular/es:

MEGMILK SNOW BRAND CO., LTD. (100.0%)
1-1, Naebocho 6-chome, Higashi-ku
Sapporo-shi, Hokkaido 0650043, JP

72 Inventor/es:

SERIZAWA, ATSUSHI;
MORITA, YOSHIKAZU;
UETSUJI, DAISUKE;
ONO, AIKO;
MATSUYAMA, HIROAKI y
HIGURASHI, SATOSHI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 547 402 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

Composiciones para fortalecer los huesos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una fracción proteica de la leche o a un producto de degradación de la fracción proteica de la leche que muestra un efecto de refuerzo del hueso.

10 Ya que la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche de acuerdo con la presente invención muestra un efecto de refuerzo del hueso, la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche es útil como agente de refuerzo del hueso que ayuda previniendo o tratando enfermedades óseas o fortaleciendo un hueso y también es útil como un principio activo de un producto farmacéutico, un alimento, una bebida o un pienso que ayuda previniendo o tratando enfermedades óseas o
15 fortaleciendo un hueso.

Antecedentes de la técnica

20 En los últimos años, diversas enfermedades óseas, tales como osteoporosis, fracturas óseas, lumbago o similares han aumentado junto con el aumento progresivo en la población anciana. En un tejido óseo, la osteogénesis y la reabsorción del hueso se dan incesantemente. En una persona joven, se mantiene un equilibrio entre la osteogénesis y la reabsorción del hueso, pero el equilibrio se interrumpe hacia la reabsorción del hueso debido a diversas causas de la edad (desacoplamiento). La continuidad de este estado durante un largo periodo de tiempo hace al tejido óseo frágil, dando como resultado que aparezcan diversas enfermedades óseas, tales como
25 osteoporosis, fracturas óseas y lumbago. Se considera que la prevención del desacoplamiento permite la prevención de diversas enfermedades óseas, tales como osteoporosis, fracturas óseas y lumbago.

Convencionalmente, para prevenir el desacoplamiento o para prevenir o tratar enfermedades óseas, se han realizado los siguientes métodos (1): suplemento de calcio mediante la dieta, (2) ejercicio ligero, (3) insolación, (4)
30 medicación y similares. Para el suplemento de calcio mediante la dieta, se usan sales de calcio, tales como carbonato de calcio, fosfato cálcico o similares, o agentes de calcio naturales tales como cáscara de huevo, polvo de raspa de pescado o similares. Sin embargo, estos materiales no son necesariamente adecuados para la ingesta oral. Correr, andar o similares pueden recomendarse como ejercicio ligero. Sin embargo, incluso el ejercicio ligero es molesto para una persona cuyo cuerpo se ha debilitado y es casi imposible para una persona mayor postrada en la
35 cama hacer ejercicio. Se considera que la insolación es un buen medio para suplementar la vitamina D₃ activada, pero no es suficiente por sí mismo. La 1 α -Hidroxivitamina D₃, una preparación de calcitonina o similares se usa para la administración de un producto farmacéutico y se sabe que es eficaz tratando la osteoporosis. Sin embargo, estas sustancias son productos farmacéuticos por sí mismos y no pueden usarse como un material alimenticio.

40 Los inventores de la presente invención han buscado un factor de refuerzo del hueso contenido en la leche para obtener una sustancia de refuerzo del hueso que pueda usarse como un material alimenticio. Como resultado, los inventores encontraron que una proteína y una mezcla de péptidos obtenidas retirando una sal derivada de un suero salino a partir de una fracción soluble en agua de una proteína serosa de la leche mostraba un efecto de refuerzo del hueso (véase Documento de Patente 1, por ejemplo). Los inventores encontraron que una fracción obtenida
45 sometiendo una solución acuosa de la proteína y de la mezcla de péptidos a un tratamiento de etanol, a un tratamiento de calor y a un tratamiento de ultrafiltración por membranas muestra un efecto promoviendo el crecimiento del osteoblasto y un efecto de refuerzo del hueso (véase Documentos de Patente 2 y 3, por ejemplo). Los inventores encontraron además que una proteína básica contenida en la leche muestra un efecto promoviendo el crecimiento del osteoblasto, un efecto de refuerzo del hueso y un efecto de prevención de la reabsorción del
50 hueso (véase Documento de Patente 4, por ejemplo).

Documento de Patente 1: JP H04-183371A, es decir JP4183371

Documento de Patente 2: JP H05-176715A, es decir JP5176715

Documento de Patente 3: JP-A-H05-320066, es decir JP05320066

55 Documento de Patente 4: JP H08-151331A, es decir JP8151331A

Divulgación de la invención**Problemas a resolverse por la invención**

60 Un objeto de la presente invención es proporcionar una fracción proteica de la leche o un producto de degradación de la fracción proteica de la leche que muestra un efecto de refuerzo del hueso y puede usarse como un material alimenticio, un agente de refuerzo del hueso que contiene la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche que muestra un efecto de refuerzo del hueso y un producto farmacéutico, un alimento, una bebida o un pienso que contiene la fracción proteica de la leche o el producto de
65 degradación de la fracción proteica de la leche que muestra un efecto de refuerzo del hueso.

Medios para resolver los problemas

Los inventores buscaron un nuevo material de refuerzo del hueso y encontraron que podía obtenerse una fracción que muestra un alto efecto de refuerzo del hueso si se compara con un material alimenticio conocido. Basándose en esos descubrimientos, los inventores obtuvieron de esta manera un agente de refuerzo del hueso que contiene la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche que muestra un efecto de refuerzo del hueso y un producto farmacéutico, un alimento, una bebida o un pienso que contiene la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche que muestra un efecto de refuerzo del hueso.

Específicamente, la presente invención se constituye como sigue:

(A) Una fracción proteica de la leche caracterizada por que (1) la fracción proteica de la leche deriva de la leche, (2) la fracción proteica de la leche contiene proteínas que tienen un peso molecular de 6000 a 150.000 daltons determinado por electroforesis en gel de dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE), (3) la fracción proteica de la leche contiene del 12 al 14 % en peso de aminoácidos básicos en la composición de aminoácidos constituyentes y tiene una relación aminoácido básico/aminoácido ácido de 0,5 a 0,7 y (4) la fracción proteica de la leche tiene un efecto promoviendo la calcificación en un osteoblasto.

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

(C) Un agente de refuerzo del hueso que comprende la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche de acuerdo con (A) o (B), respectivamente.

(D) Un producto farmacéutico de refuerzo del hueso que comprende la fracción proteica de la leche de acuerdo con (A) o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche de acuerdo con (A) o (B), respectivamente.

(E) Un alimento o una bebida de refuerzo del hueso que comprende la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche de acuerdo con (A) o (B), respectivamente.

(F) Un pienso de refuerzo del hueso que comprende la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche de acuerdo con (A) o (B), respectivamente.

Efectos de la invención

El agente de refuerzo del hueso que contiene la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche que muestra un efecto de refuerzo del hueso como un principio activo y el producto farmacéutico, el alimento, la bebida o el pienso de refuerzo del hueso que contiene la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche que muestra un efecto de refuerzo del hueso de acuerdo con la presente invención promueven la calcificación en un osteoblasto en un cuerpo cuando se toman oralmente.

Por lo tanto, el agente de refuerzo del hueso que contiene la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche que muestra un efecto de refuerzo del hueso como un principio activo y el producto farmacéutico, el alimento, la bebida o el pienso de refuerzo del hueso que contiene la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche que muestra un efecto de refuerzo del hueso de acuerdo con la presente invención muestran un efecto de refuerzo del hueso promoviendo la calcificación en un osteoblasto en el cuerpo de un humano o de un animal y son eficaces para suprimir una disminución en la masa ósea debido a la osteoporosis o similares.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista ilustrativa del efecto de promover la calcificación de una fracción proteica de la leche (Ejemplo de ensayo 1).

La Figura 2 es una vista que muestra un efecto de mejora de la resistencia del fémur cuando se administra una fracción proteica de la leche obtenida en el Ejemplo 1 de la presente invención a ratas que tienen osteoporosis (Ejemplo de ensayo 2).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se refiere a un agente de refuerzo del hueso que incluye una fracción proteica de la leche o un producto de degradación de la fracción proteica de la leche que muestra un efecto de refuerzo del hueso como un principio activo, así como un producto farmacéutico, alimento o bebida y pienso de refuerzo del hueso que incluye una fracción proteica de la leche o un producto de degradación de la fracción proteica de la leche que muestra un efecto de refuerzo del hueso.

La fracción proteica de la leche de acuerdo con la presente invención que muestra un efecto de refuerzo del hueso puede obtenerse poniendo un material sin tratar de leche, tal como leche desnatada, suero de leche o similares en contacto con una resina de intercambio catiónico, lavando la resina de intercambio catiónico con agua desionizada y

eluyendo la proteína de la leche adsorbida en la resina de intercambio catiónico usando un eluyente de cloruro sódico 0,2 M. Obsérvese que puede usarse sal tal como una sal de potasio, una sal de amonio, un fosfato, un acetato, un carbonato o similares además del cloruro sódico. La fracción proteica de la leche de acuerdo con la presente invención puede obtenerse ajustando apropiadamente la fuerza iónica del agente de lavado a 0,05 o
5 menos y la fuerza iónica de la solución de elución de 0,15 a 0,25. Además, la fracción proteica de la leche de acuerdo con la presente invención puede obtenerse recogiendo la fracción eluida, desalando y concentrando la fracción usando una membrana de ósmosis inversa (RO), electrodiálisis (ED) o similares y secando opcionalmente el producto resultante. Los ejemplos de la membrana de ósmosis inversa (RO) incluyen Desal-3 (fabricado por Desalination), HR-95 (fabricado por Dow Danmark), NTR-729HF (fabricado por Nitto Denko Corporation) y similares.
10 Los ejemplos de un sistema de electrodiálisis incluyen sistemas de electrodiálisis fabricados por Yuasa-Ionics Inc. y Nippon Rensui Co., Ltd.

Como un método para obtener una fracción proteica derivada de la leche, se han conocido un método para obtener una fracción proteica poniendo en contacto leche o una materia prima derivada de la leche en contacto con un
15 intercambiador catiónico y eluir la fracción proteica básica que se adsorbe en el intercambiador catiónico usando un eluyente que tiene un pH de más de 5 y una fuerza iónica de más de 0,5 (JP-A-H05-202098 es decir JP05202098), un método para obtener una fracción proteica usando un gel de ácido alginico (JP-A-S61-246198 es decir JP61246198), un método para obtener una fracción proteica de la leche usando un compuesto de éster sulfatado (JP-A-S63-255300 es decir JP63255300) y similares. Las fracciones proteicas obtenidas por estos métodos pueden
20 usarse como la fracción proteica que deriva de la leche y que muestra un efecto de refuerzo del hueso de acuerdo con la presente invención.

La fracción proteica de la leche recogida de esta forma puede pulverizarse normalmente por secado por congelación o similares antes de usar.
25

La fracción proteica que muestra un efecto de refuerzo del hueso usada en la presente invención contiene preferentemente del 12 al 14 % en peso de aminoácidos básicos en la composición de aminoácidos constituyentes y tiene una relación aminoácido básico/aminoácido ácido de 0,5 a 0,7. El efecto de la presente invención puede no lograrse si el contenido de aminoácidos básicos o la ratio aminoácido básico/aminoácido ácido están fuera del
30 intervalo anterior. La fracción proteica de la leche de acuerdo con la presente invención es una mezcla de varias proteínas que tienen un peso molecular de 6000 a 150.000 daltons y el punto isoeléctrico de las mismas se distribuye ampliamente en un intervalo de 6 a 11.

El producto de degradación de la fracción proteica de la leche tiene la misma composición de aminoácidos que la de la fracción proteica de la leche. Por ejemplo, un producto de degradación de la fracción proteica de la leche que tiene un peso molecular medio de 4000 o menos puede obtenerse tratando una fracción proteica de la leche obtenida por el método anterior con una proteasa tal como pepsina, tripsina, quimiotripsina o similares y
35 opcionalmente tratando el producto resultante con una proteasa tal como pancreatina o similares. El producto de degradación de la fracción proteica de la leche se pulveriza normalmente por secado por congelación o similares antes de usar.
40

Como leche o una materia prima derivada de la leche que pueda usarse como fuente de la fracción proteica de la leche de acuerdo con la presente invención que muestra un efecto de refuerzo del hueso, puede darse leche de vaca, leche humana, leche de cabra, leche de oveja o similares. Tales leches pueden usarse como son, o pueden
45 usarse leche recombinada, leche desnatada, suero o similares derivados de tales leches.

La fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche que muestra un efecto de refuerzo del hueso y que es un principio activo puede usarse como es cuando se administra el agente de refuerzo del hueso de acuerdo con la presente invención. Nótese que también es posible usarlo después de haberlo
50 formulado en un producto farmacéutico en polvo, gránulos, un comprimido, una cápsula, una preparación bebible o similares de acuerdo con un método convencional. Además, la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche, como es o después de formular una preparación de la misma, puede añadirse a una preparación de nutrientes, un alimento y una bebida o similares para lograr un efecto de refuerzo del hueso. Ya que la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche de
55 acuerdo con la presente invención es relativamente estable frente al calor, la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche pueden esterilizarse por calor en condiciones convencionales.

En la presente invención, para lograr un efecto de refuerzo del hueso la dosificación o similares deben determinarse apropiadamente teniendo en cuenta el peso, el sexo, la edad y similares. La fracción proteica de la leche o el
60 producto de degradación de la fracción proteica de la leche pueden ajustarse la cantidad de la formulación de las mismas de tal manera que un adulto normal tome la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche de la presente invención en una cantidad de 1 a 50 mg/día. Esto es, la fracción proteica de la leche o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche de acuerdo con la presente invención es eficaz a una dosificación baja. En la presente invención, el ingrediente que tiene un efecto de refuerzo del hueso
65 ejerce el efecto de refuerzo del hueso cuando se administra oralmente un agente de refuerzo del hueso o un

producto farmacéutico, un alimento y una bebida o un pienso del agente de refuerzo del hueso formulado.

La presente invención se describe adicionalmente a continuación a modo de ejemplos de referencia, ejemplos y ejemplos de ensayo. Obsérvese que los siguientes ejemplos ilustran meramente varios aspectos de la presente invención y no deberían construirse como limitantes de la presente invención.

Ejemplo de referencia 1

Una fracción proteica de la leche que muestra un efecto de refuerzo del hueso que estaba disponible en el mercado se preparó de acuerdo con el siguiente método (véase Patente Japonesa nº 3112637).

Una columna (diámetro: 10 cm) cargada con 0,5 litros de Chitopearl sulfonada (resina de intercambio catiónico; fabricada por Fuji Spinning Co., Ltd.) se lavó suficientemente con agua desionizada. Después de pasar 501 l de leche desnatada sin esterilizar a través de la columna a una velocidad de caudal de 10 ml/min, la columna se lavó suficientemente con agua desionizada. Después se pasaron 2,5 l de un tampón fosfato 0,05 M (pH 7,0) que contiene cloruro sódico 0,95 M a través de la columna para eluir las proteínas adsorbidas en la resina. El eluido se desaló y se concentró por medio de un tratamiento de membrana de ósmosis inversa (RO) y después se secó por congelación para obtener una fracción proteica de la leche en polvo. El procedimiento anterior se repitió dos veces para obtener 10⁴ g de una fracción proteica. La fracción proteica tenía un punto isoeléctrico de 7,0 a 8,5. El contenido de aminoácidos básicos en la fracción proteica era del 17,8 %.

Ejemplo 1

Una columna (diámetro: 10 cm) cargada con 0,5 litros de Chitopearl sulfonada (resina de intercambio catiónico; fabricada por Fuji Spinning Co., Ltd.) se lavó suficientemente con agua desionizada. Después de pasar 501 l de leche desnatada sin esterilizar a través de la columna a una velocidad de caudal de 100 ml/min, la columna se lavó suficientemente con agua desionizada. Después se pasaron 2,5 l de un tampón fosfato 0,05 M (pH 7,0) que contiene cloruro sódico 0,15 M a través de la columna para eluir las proteínas adsorbidas en la resina. El eluido se desaló y se concentró por medio de un tratamiento de membrana de ósmosis inversa (RO) y después se secó por congelación para obtener una fracción proteica de la leche en polvo. El procedimiento anterior se repitió diez veces para obtener 24,2 g de una fracción proteica. La fracción proteica tenía un peso molecular de 6000 a 150.000 daltons y un punto isoeléctrico de 6,0 a 11,0. El contenido de aminoácidos básicos en los aminoácidos constituyentes contenidos en la fracción proteica era del 12 al 14 %. La fracción proteica tenía una relación aminoácido básico/aminoácido ácido de 0,5 a 0,7.

Ejemplo 2

Una columna (diámetro: 10 cm) cargada con 0,5 litros de Chitopearl sulfonada (resina de intercambio catiónico; fabricada por Fuji Spinning Co., Ltd.) se lavó suficientemente con agua desionizada. Después de pasar 501 l de leche desnatada sin esterilizar a través de la columna a una velocidad de caudal de 100 ml/min, la columna se lavó suficientemente con un tampón fosfato 0,05 M (pH 7,0) que contiene cloruro sódico 0,05 M. Después se pasaron 2,5 l de un tampón fosfato 0,05 M (pH 7,0) que contiene cloruro sódico 0,25 M a través de la columna para eluir las proteínas adsorbidas en la resina. El eluido se desaló y se concentró por medio de un tratamiento de membrana de ósmosis inversa (RO) y después se secó por congelación para obtener una fracción proteica de la leche en polvo. El procedimiento anterior se repitió cinco veces para obtener 12,8 g de una fracción proteica. La fracción proteica tenía un peso molecular de 6000 a 150.000 daltons y un punto isoeléctrico de 6,0 a 11,0. El contenido de aminoácidos básicos en los aminoácidos constituyentes contenidos en la fracción proteica era del 12 al 14 %. La fracción proteica tenía una relación aminoácido básico/aminoácido ácido de 0,5 a 0,7.

Ejemplo 3

24,2 g de la fracción proteica obtenida en el Ejemplo 1 se disolvieron en 10 l de agua destilada. Después de añadir pepsina (fabricada por Kanto Kagaku Co., Ltd) de tal manera de la concentración fuera del 2 %, la fracción proteica de la leche se hidrolizó a 37 °C durante una hora con agitación. Después de que la mezcla se neutralizara a pH 6,8 con una solución de hidróxido sódico, se añadió a la misma pancreatina al 1 % (fabricada por Sigma). La mezcla se hizo reaccionar después a 37 °C durante dos horas. Después de que se completara la reacción, la proteasa se inactivó calentando la mezcla a 80 °C durante 10 minutos para obtener 23,1 g de un producto de degradación de la fracción proteica de la leche.

Ejemplo 4

12,8 g de la fracción proteica obtenida en el Ejemplo 2 se disolvieron en 8 l de agua destilada. Después de añadir tripsina (fabricada por Kanto Kagaku Co., Ltd) de tal manera de la concentración fuera del 2 %, la fracción proteica de la leche se hidrolizó a 37 °C durante una hora con agitación. Después de que la mezcla se neutralizara a pH 6,6 con una solución de hidróxido sódico, se añadió a la misma pancreatina al 1 % (fabricada por Sigma). La mezcla se hizo reaccionar después a 37 °C durante dos horas. Después de que se completara la reacción, la proteasa se

inactivó calentando la mezcla a 80 °C durante 10 minutos para obtener 11,7 g de un producto de degradación de la fracción proteica de la leche.

Ejemplo de ensayo 1

5 Las fracciones proteicas obtenidas en el Ejemplo de referencia 1 y en el Ejemplo 1 se ensayaron de acuerdo con el método propuesto por Danjo et al. (Danjo. A. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 360, pág. 199-204, 2007). Específicamente, se suspendieron células MC3T3-E1 similares a osteoblastos procedentes de la bóveda craneana de ratón se suspendieron en un medio α MEM+FBS al 10 % de tal manera que la densidad celular fue 10 5×10^3 células/cm² y se sembraron en una placa de cultivo de 24 pocillos. Después de dejar a las células que reposaran durante 12 horas, el medio se reemplazó con un medio de calcificación (5 μ g/ml de α MEM+FBS al 10 % + β -glicerofosfoácido 5 mM) y la proteína de la leche obtenida en el Ejemplo de referencia 1 o la proteína de la leche obtenida en el Ejemplo 1 se añadió hasta una concentración de 10^{-10} a 10^{-5} M. Las células se cultivaron durante 28 días mientras se cambiaba el medio cada tres días.

15 Los días 14, 21 o 28, las células se fijaron a temperatura ambiente durante 10 minutos usando un tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) que contenía paraformaldehído al 4 %. Después de lavar con PBS 0,01 M, las células se hicieron reaccionar con una solución acuosa de alizarina roja S al 2 % a temperatura ambiente durante 15 minutos para someterlas a tinción del calcio. Para teñir el ácido fosfórico, que es uno de los componentes inorgánicos del hueso, 20 las células fijadas se lavaron con agua destilada y se hicieron reaccionar con una solución acuosa de nitrato de plata al 5 % a temperatura ambiente durante una hora para someterlas a la tinción de von Kossa. Se usó un kit de calcio C (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para determinar la cantidad de iones calcio en el nódulo calcificado.

25 La Figura 2 muestra los resultados de la medida de contenido de calcio obtenidos el día 28. Un grupo cultivado solamente en un medio al que no se añadió muestra se usó como un control.

30 La proteína de la leche de la presente invención obtenida en el Ejemplo 1 se admitió que promovía la calcificación en el osteoblasto en proporción a la dosificación. La proteína de la leche obtenida en el Ejemplo de Referencia 1 también se admitió un efecto similar, pero el efecto de promover la calcificación del osteoblasto se determinó que era más débil en comparación con la presente invención.

Ejemplo de ensayo 2

35 El efecto de refuerzo del hueso de las fracciones proteicas obtenidas en el Ejemplo de referencia 1 y en el Ejemplo 1 se investigó mediante experimentos en animales. Se usaron ratas Wistar (hembras, 4 semanas de edad) para los experimentos en animales. Después de una alimentación preliminar durante una semana, el ovario se retiró de cada rata. Se suministró después a las ratas un alimento deficiente en calcio durante cinco semanas. Las ratas a las que se había retirado el ovario y a las que se había suministrado un alimento deficiente en calcio tenían obviamente 40 osteoporosis. Las ratas que tenían osteoporosis se dividieron en 5 grupos experimentales (seis ratas por cada grupo) de un grupo control (Grupo A) al que no se administró una fracción proteica de la leche, un grupo (Grupo B) al que se administró un 0,5 % en peso de la fracción proteica de la leche obtenida en el Ejemplo de referencia 1, un grupo (Grupo C) al que se administró un 0,1 % en peso de la fracción proteica de la leche obtenida en el Ejemplo 1, un grupo (Grupo D) al que se administró un 0,5 % en peso de la fracción proteica de la leche obtenida en el Ejemplo 1 y un grupo (Grupo E) al que se administró un 1,0 % en peso de la fracción proteica de la leche obtenida en el 45 Ejemplo 1. Un suministro de ensayo en la Tabla 1 se suministró a cada grupo durante cuatro meses. El contenido de nitrógeno en cada suministro de ensayo se ajustó al 17,06 % usando caseína. Cada suministro de ensayo se mezcló con 300 mg de calcio, 230 mg de fósforo y 50 mg de magnesio por 100 g del suministro de ensayo.

50

Tabla 1

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

	Grupo				
	A	B	C	D	E
Fracción proteica de la leche obtenida en el Ejemplo 1	-	-	0,1	0,5	0,1
(% en peso)					

Después de cuatro meses, los fémures de ambas piernas se retiraron de las ratas de cada grupo de ensayo y se midió la resistencia del hueso usando un instrumento de medición de fractura ósea ("Reómetro Max RX-1600" fabricado por Aitecno Inc.). Los resultados se muestran en la Figura 2. Como se muestra en la Figura 2, los estreses de fractura del fémur del grupo (Grupo B) que fue administrado con la fracción proteica de la leche obtenida en el Ejemplo de referencia 1 y los grupos (Grupos C, D y E) que fueron administrados con la fracción proteica de la leche obtenida en el Ejemplo 1 se encontraron que eran mayores que los del grupo control (Grupo A: sin adición de fracción proteica de la leche). El estrés de fractura del fémur aumentó como el aumento de concentración de la fracción proteica obtenida en el Ejemplo 1. A pesar de que la fracción proteica de la leche obtenida en el Ejemplo de referencia 1 mostró un efecto de aumento del estrés de fractura del fémur, el efecto se encontró que era más débil que el de la fracción proteica obtenida en el Ejemplo 1.

Se observaron efectos similares cuando se usaron los productos de degradación de la fracción proteica de la leche obtenidos en los Ejemplos 3 y 4 (pero no se muestran en la Figura 2).

Ejemplo 5

Se añadieron 100 mg de la fracción proteica de la leche del Ejemplo 1 con 93,4 g de hidrato de glucosa cristalina, 5 g de carbonato cálcico, 1 g de éster de azúcar y 0,5 g de sabor y la mezcla se mezcló. Lo resultante después se formó en un comprimido para obtener un agente de refuerzo del hueso de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo 6

Los componentes se mezclaron de acuerdo con la composición mostrada en la Tabla 2 para obtener una masa. La masa se formó y se horneó para producir una galleta para prevenir o aliviar diversas enfermedades óseas, tales como osteoporosis.

Tabla 2

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

Ejemplo 7

Se produjo una bebida de zumo de frutas de refuerzo del hueso que tiene una composición mostrada en la Tabla 3.

Tabla 3

Azúcar isomerizado mezclado	15,0 % (en peso)
Zumo de futa	10,0
Ácido cítrico	0,5
Polvo de fracción proteica de la leche (Ejemplo 1)	0,5
Sabor	0,1
Calcio	0,1
Agua	73,8

Ejemplo 8

Los ingredientes se mezclaron de acuerdo con la formulación mostrada en la Tabla 4 para producir un alimento para perros de refuerzo del hueso.

5

Tabla 4

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

Ejemplo 9

- 10 Cada ingrediente se mezcló de acuerdo con la formulación mostrada en la Tabla 5 y se formó a presión para producir un comprimido de refuerzo de los huesos que contiene el producto de degradación de la fracción proteica de la leche obtenido en el Ejemplo 3.

Tabla 5

Hidrato de glucosa cristalina	59,4 % (en peso)
Polvo de fracción proteica de la leche (Ejemplo 3)	16,0
Almidón de maíz	12,0
Celulosa	4,0
Aceite de maíz	4,0
Mezcla de vitaminas (incluyendo colina)	1,0
Mezcla de minerales	3,6

15

Ejemplo 10

20 Cada ingrediente se mezcló de acuerdo con la formulación mostrada en la Tabla 6 y se emulsionó a 85 °C para producir un queso procesado de refuerzo del hueso que contiene el producto de degradación de la fracción proteica de la leche obtenido en el Ejemplo 4.

Tabla 6

Queso gouda	43,0 % (en peso)
Queso cheddar	43,0
Citrato sódico	2,0
Polvo de fracción proteica de la leche (Ejemplo 4)	0,5
Calcio derivado de la leche	1,0
Agua	10,5

Aplicabilidad industrial

25

Ya que la fracción proteica de la leche de acuerdo con la presente invención muestra un efecto de refuerzo del hueso, la fracción proteica de la leche es útil para prevenir o tratar enfermedades óseas como un agente de refuerzo del hueso que ayuda fortaleciendo un hueso y similares. Además, ya que el producto de la presente invención es seguro, es posible usarlo como un producto farmacéutico, un alimento, una bebida o un pienso de prevención/tratamiento de una enfermedad ósea.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una fracción proteica de la leche que tiene las siguientes características (1) a (4); (1) la fracción proteica de la leche deriva de la leche, (2) la fracción proteica de la leche contiene proteínas que tienen un peso molecular de 6000 a 150.000 daltons determinado por electroforesis en gel de dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE), (3) la fracción proteica de la leche contiene del 12 al 14 % en peso de aminoácidos básicos en la composición de aminoácidos constituyentes y tiene una relación aminoácido básico/aminoácido ácido de 0,5 a 0,7 y (4) la fracción proteica de la leche tiene un efecto promoviendo la calcificación en un osteoblasto.
- 10 2. Un producto de degradación de la fracción proteica de la leche obtenido degradando la fracción proteica de la leche de acuerdo con la reivindicación 1 con una proteasa.
- 15 3. Un agente de refuerzo del hueso que comprende la fracción proteica de la leche de acuerdo con la reivindicación 1 o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche de acuerdo con la reivindicación 2.
4. Un producto farmacéutico de refuerzo del hueso que comprende la fracción proteica de la leche de acuerdo con la reivindicación 1 o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche de acuerdo con la reivindicación 2.
- 20 5. Un alimento o una bebida de refuerzo del hueso que comprende la fracción proteica de la leche de acuerdo con la reivindicación 1 o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche de acuerdo con la reivindicación 2.
6. Un pienso de refuerzo del hueso que comprende la fracción proteica de la leche de acuerdo con la reivindicación 1 o el producto de degradación de la fracción proteica de la leche de acuerdo con la reivindicación 2.

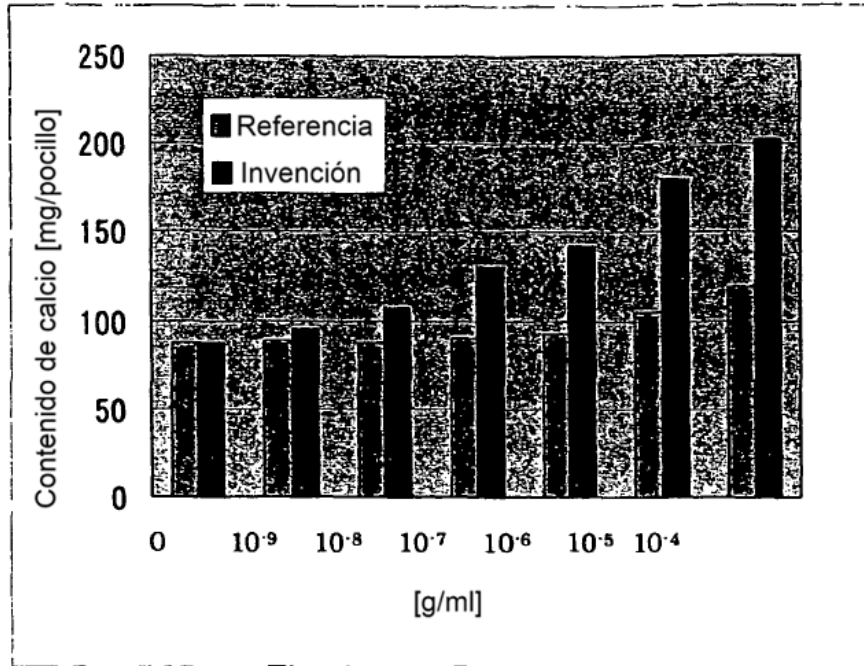


Fig. 1

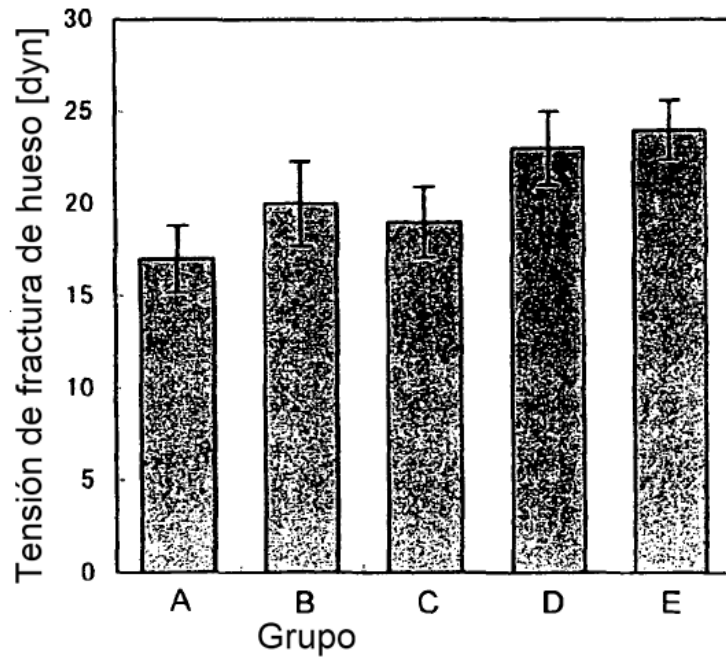


Fig. 2