

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 928**

51 Int. Cl.:

A61K 38/01 (2006.01)

A61K 35/32 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2013 PCT/EP2013/072894**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072235**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2013 E 13789518 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2916855**

54 Título: **Hidrolizado de colágeno y su uso**

30 Prioridad:

06.11.2012 DE 102012110612

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

27.10.2016

73 Titular/es:

**GELITA AG (100.0%)
Uferstrasse 7
69412 Eberbach, DE**

72 Inventor/es:

**OESSER, STEFFEN;
GIESEN-WIESE, MONIKA;
FRECH, HANS-ULRICH y
HAUSMANN, STEPHAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 587 928 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

Hidrolizado de colágeno y su uso

La presente invención se refiere a un nuevo tipo de hidrolizado de colágeno.

5 La invención se refiere, además, al uso de este nuevo tipo de hidrolizado de colágeno como principio activo para conservar y/o mejorar la salud del tejido óseo, en particular, para la prevención y/o el tratamiento de la osteoporosis. Adicionalmente, la invención hace referencia a un complemento alimenticio que comprende el hidrolizado de colágeno.

10 El tejido óseo de los animales vertebrados y, por lo tanto, también el humano, debe su elevada resistencia y estabilidad mecánica a la especial formación de la matriz ósea, sintetizada por los osteoblastos (células óseas). Los dos componentes esenciales de la matriz ósea son, por una parte, una estructura formada por colágeno reticulado que, sobre todo en el caso de la matriz ósea, es colágeno de tipo I. Esta reticulación se efectúa esencialmente a través de los aminoácidos lisina e hidroxilisina. El segundo componente es hidroxiapatita (denominada también apatita-(CaOH)), que se deposita en la matriz ósea (mineralización del hueso). Esta estructura del tejido óseo es, *grosso modo*, comparable a la del hormigón armado, en la que las propiedades del armazón de acero (correspondiente al colágeno) y del hormigón (correspondiente a la hidroxiapatita) se complementan también con la formación de una estructura extremadamente firme.

20 Al contrario que muchos otros tipos de tejidos, el hueso exhibe una capacidad de regeneración relativamente alta, es decir, la matriz ósea extracelular está en un proceso continuo de formación y destrucción. Si se produce una alteración de este equilibrio, a saber, una formación insuficiente de nueva matriz ósea, se produce una pérdida de tejido óseo. Esta disminución de la densidad ósea se designa como osteoporosis y puede tener diversas causas. De manera típica, la osteoporosis aparece con la edad avanzada (a menudo, después del inicio de la quinta década de vida) y, de forma especialmente frecuente, en la mujer después de la menopausia (osteoporosis postmenopáusica).

25 Desde hace algún tiempo, se sabe que mediante la administración de hidrolizados de colágeno por vía oral es posible contrarrestar la pérdida de densidad ósea en la osteoporosis. Los hidrolizados de colágeno, que se obtienen por hidrólisis enzimática de colágeno de origen animal, comprenden respectivamente una mezcla de péptidos con diferentes longitudes de cadena o pesos moleculares. La Patente Europea EP 0777491 B1 da a conocer, por ejemplo, el uso de un hidrolizado de colágeno con un peso molecular medio de 1.000 a 40.000 Da, preparado por hidrólisis enzimática de colágeno de la piel, para tratar la osteoporosis postmenopáusica. Se supone que este efecto beneficioso del hidrolizado de colágeno sobre la salud del tejido óseo se debe a una estimulación de la biosíntesis de colágeno de tipo I y otras proteínas de la matriz por medio de los osteoblastos, de manera similar a lo que se ha podido comprobar *in vitro* para los condrocitos (véase S. Oesser y J. Seiffert (2003), *Cell Tissue Research*, (311), 393-399).

35 El documento DE 102011000997 A1 da a conocer una composición con fines nutricionales con una eficacia optimizada con respecto a la formación de matriz ósea, que comprende aproximadamente 1 hasta aproximadamente 99% en peso de hidrolizado de colágeno y aproximadamente 1 hasta aproximadamente 99% en peso de uno o múltiples prebióticos, siempre en relación con la masa seca de la composición.

El documento DE 102010060564 A1 da a conocer el uso de un hidrolizado de colágeno para mejorar la salud de la piel, cabello y/o uñas del ser humano, en donde al menos 70% en peso del hidrolizado de colágeno tiene un peso molecular menor que aproximadamente 3.500 Da.

40 En un artículo de M.C. Gómez-Guillén et al. (2011) publicado en *Food Hydrocolloids* (25), 1813-1827, se ofrece un resumen sobre las propiedades funcionales y bioactivas del colágeno y gelatinas de orígenes alternativos, así como sobre los hidrolizados preparados a partir de los mismos.

45 Los diversos hidrolizados de colágeno se diferencian por la distribución del peso molecular de los péptidos que contienen, su secuencia de aminoácidos y otros parámetros, el material de partida y el procedimiento de fabricación. La presente invención tiene la tarea de proponer un hidrolizado de colágeno que posea una eficacia especialmente elevada en relación con la conservación y/o la mejoría de la salud del tejido óseo.

50 Esta misión se resuelve mediante un hidrolizado de colágeno, preparado por hidrólisis enzimática a partir de gelatina ósea de tipo B, en donde el hidrolizado está compuesto por péptidos, de los cuales al menos 50% en peso tiene un peso molecular de 1.500 a 13.500 Da, y cuyo peso molecular medio se encuentra en el intervalo de 4.500 a 6.000 Da.

55 Los estudios llevados a cabo por los inventores acerca de la estimulación de la síntesis de proteínas de la matriz por medio de osteoblastos *in vitro*, que se describen detalladamente más adelante, han demostrado sorprendentemente que el hidrolizado de colágeno de este tipo, en comparación con otros hidrolizados diferentes, muestra una estimulación significativamente mayor, en especial sobre la síntesis de colágeno de tipo I. Un hidrolizado de colágeno en el que al menos 70% en peso de los péptidos tiene un peso molecular de 1.500 a 13.500 Da, ha demostrado ser particularmente conveniente.

- 5 En este resultado, es particularmente interesante la alta eficacia de un hidrolizado de colágeno especial, preparado a partir de gelatina ósea, en el que se utilizan hidrolizados de colágeno o gelatinas procedentes de la piel de animales (principalmente, de la piel de cerdo, pero también, por ejemplo, a partir de las pieles de peces), ya conocido de la técnica anterior. En general, la gelatina, como forma desnaturalizada y soluble de colágeno, constituye un material de partida adecuado para la hidrólisis enzimática. La gelatina ósea usada, en el marco de la invención, como material de partida para el hidrolizado, es una gelatina de tipo B preparada preferiblemente por una digestión alcalina del colágeno a partir del tejido óseo de animales vertebrados, en particular, a partir de oseína. La oseína es tejido óseo desgrasado y desmineralizado. De manera favorable, se utiliza oseína de huesos de ganado bovino.
- 10 El punto isoelectrico (IEP) de la gelatina ósea usada como material de partida es, preferiblemente, menor que 5,5. Por el contrario, las gelatinas de tipo A, preparadas por una digestión ácida del colágeno, tienen un punto isoelectrico mayor que 7.
- 15 En el hidrolizado de colágeno según la invención, los péptidos poseen, preferiblemente, un grado de amidación de los restos de glutamina o ácido glutámico y de los restos de asparagina o del ácido aspártico por lo general menor de 15%, en especial, menor de 10%. Según esto, el grado de amidación se calcula dividiendo la fracción molar de los restos de glutamina y asparagina por la fracción molar de los restos de glutamina, ácido glutámico, asparagina y ácido aspártico en los péptidos. Este último valor mencionado se obtiene de la composición natural de aminoácidos del colágeno y, típicamente, es de aproximadamente 1,12 mmol/g. La fracción molar de los restos de glutamina y asparagina se puede calcular por la hidrólisis ácida de las amidas y la determinación del amoniaco formado de este modo. Es posible alcanzar un grado de amidación más bajo de los péptidos sobre todo por la digestión alcalina de la gelatina empleada (Tipo B).
- 20 Es interesante señalar que los estudios sobre la estimulación de la síntesis de proteínas de la matriz por medio de los osteoblastos también han demostrado que el hidrolizado de colágeno según la invención, con un peso molecular medio preferido de 4.600 a 6.000 Da, exhibe mayor eficacia que diversos hidrolizados de menor peso molecular. Asimismo, la viscosidad del hidrolizado de colágeno se correlaciona también con el peso molecular de los péptidos obtenidos. En este sentido, se prefiere que una solución acuosa al 20% en peso del hidrolizado de colágeno tenga a 25°C una viscosidad mayor que 5 mPa·s, en especial, mayor que 6 mPa·s.
- 25 El hidrolizado de colágeno según la invención tiene preferiblemente un contenido menor que 300 ppm tanto de amonio como de sulfato y fosfato, en particular, menor que 100 ppm. Contenidos correspondientemente bajos de sales se pueden alcanzar ya durante la preparación de la gelatina ósea usada para la hidrólisis.
- 30 Para la preparación enzimática del hidrolizado de colágeno se pueden utilizar diferentes proteasas, en especial de origen microbiano, en donde sus distintas especificidades por determinados aminoácidos influyen sobre la estructura molecular de los péptidos resultantes y, por lo tanto, actúan directamente sobre su eficacia. Se ha demostrado que, en lo que respecta a la estimulación de los osteoblastos, se puede preparar un hidrolizado de colágeno especialmente eficaz, preferiblemente por medio de la hidrólisis de la gelatina con endoproteasa neutra de *Bacillus subtilis*.
- 35 Según una realización preferida de la invención, el hidrolizado de colágeno se prepara mediante la acción de la endoproteasa a una temperatura de 40 a 60°C, en especial, de aproximadamente 50°C, durante un periodo de tiempo de 20 a 40 min, en especial, durante aproximadamente 30 min.
- 40 La presente invención se refiere, además del hidrolizado de colágeno como tal, que se ha descrito anteriormente, particularmente también a su uso como principio activo para conservar y/o mejorar la salud del tejido óseo, sobre todo para la prevención y/o el tratamiento de la osteoporosis. Debido a la marcada acción estimulante del hidrolizado de colágeno según la invención sobre la síntesis de proteínas de la matriz por medio de los osteoblastos, que se ha confirmado mediante ensayos *in vitro*, la administración del hidrolizado de colágeno por vía oral permite contrarrestar la alteración del equilibrio entre la formación y destrucción del tejido óseo.
- 45 Un aspecto fundamental de la invención se refiere al uso del hidrolizado de colágeno como principio activo para la prevención y/o el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica. Esta forma de pérdida de tejido óseo afecta, según estimaciones, a aproximadamente 50% de las mujeres con edades superiores a 50 años; durante los cinco primeros años de menopausia se puede perder hasta 20% de materia ósea.
- 50 La presente invención se refiere, por tanto, también a un procedimiento para la prevención y/o el tratamiento de la osteoporosis, sobre todo de la osteoporosis postmenopáusica, en donde el procedimiento comprende la administración por vía oral del hidrolizado de colágeno según la invención a un paciente, en especial, a una paciente de sexo femenino mayor de 50 años.
- 55 Dado que para los hidrolizados de proteínas animales o vegetales no se requiere una autorización como medicamento, el hidrolizado de colágeno según la invención se puede formular convenientemente como un complemento alimenticio. Por ejemplo, el hidrolizado de colágeno puede estar presente en forma de polvo, granulado, una solución o una suspensión, o en forma de comprimidos, cápsulas, pastillas o sobres, eventualmente en combinación con adyuvantes o coadyuvantes apropiados. De manera alternativa, el hidrolizado de colágeno se puede agregar también directamente a un alimento.

La toma oral diaria se encuentra, preferiblemente, en el intervalo de 1 hasta 15 g del hidrolizado de colágeno, preferiblemente, de 2 a 10 g, más preferiblemente, de 2 a 7 g y, en particular, en el intervalo de 2,5 a 5 g. La cantidad correspondiente se puede formular, de modo conveniente, como una única dosis diaria.

5 Una realización preferida adicional de la invención se refiere a un complemento alimenticio que, además del hidrolizado de colágeno según la invención, comprende uno o múltiples prebióticos. La combinación del hidrolizado de colágeno con uno o múltiples prebióticos tiene como base la consideración de que para lograr una regeneración especialmente eficaz de la materia ósea, se debe estimular no sólo la biosíntesis de colágeno y otras proteínas de la matriz, sino también la formación y el depósito de hidroxiapatita en cantidad suficiente. Un factor limitante en este caso es la aportación de la matriz ósea de calcio, en donde el problema no consiste en una administración suficiente de calcio con la alimentación (normalmente, está garantizada por una nutrición equilibrada), sino la absorción intestinal de calcio, que está limitada por la formación de sales de calcio difícilmente solubles.

10 Se ha demostrado que la administración de prebióticos puede mejorar la absorción de calcio y, por consiguiente, la mineralización del tejido óseo. En general, los prebióticos son componentes no digeribles de los alimentos capaces de potenciar de manera dirigida el crecimiento y/o la actividad de determinados microorganismos de la flora intestinal, generando de este modo un efecto positivo sobre la salud. Aún no se ha dilucidado por completo el mecanismo exacto por el cual este efecto de los prebióticos se manifiesta sobre la absorción del calcio; sin embargo, el mencionado efecto positivo se ha confirmado, por ejemplo, para la administración de fructanos en niños de aproximadamente 12 años de edad (véase S. Abrams et al. (2005), *American Journal of Clinical Nutrition* (82), 471-476).

15 Por lo tanto, mediante la administración conjunta de hidrolizado de colágeno y prebióticos se puede estimular la formación de los dos componentes esenciales de la matriz ósea y lograr, de este modo, un efecto sinérgico en relación con la salud del tejido óseo, sobre todo en lo que respecta a la prevención y/o el tratamiento de la osteoporosis.

20 En principio, el complemento alimenticio según la invención puede comprender el hidrolizado de colágeno y el o los prebióticos en cualquier proporción de peso. Con el fin de garantizar una aportación suficiente de ambos componentes, es preferible, sin embargo, que la proporción del hidrolizado de colágeno y la del o de los prebióticos sea, respectivamente, de aproximadamente 20 a aproximadamente 80% en peso y, más preferiblemente, de aproximadamente 40 a aproximadamente 60% en peso, respectivamente. El complemento alimenticio puede comprender, en especial, una mezcla de los dos componentes en una proporción de peso de aproximadamente 1:1.

25 El o los prebióticos utilizados en el complemento alimenticio según la invención se seleccionan preferiblemente de oligo- y/o polisacáridos. Los oligo- y polisacáridos constituyen la mayor parte de las sustancias activas con acción prebiótica conocidas y, mediante el empleo de este tipo de sustancias, se obtiene el efecto ventajoso adicional de que se mejora claramente el sabor del complemento alimenticio en comparación con el hidrolizado de colágeno puro. Aunque por el procedimiento correspondiente es posible preparar hidrolizados de colágeno cuyo sabor se puede calificar por lo general como neutro, muchos consumidores perciben como inconveniente la presencia de un sabor definido como "pegajoso". Sorprendentemente, los componentes de sabor negativo del hidrolizado de colágeno se pueden eliminar casi por completo mediante la combinación con oligo- y/o polisacáridos prebióticos.

30 El o los prebióticos se seleccionan preferiblemente de inulina, fructanos, galactooligosacáridos (GOS), fructooligosacáridos (FOS), maltodextrinas resistentes, polidextrosa y mezclas de los mismos. Estos comprenden tanto sacáridos de origen natural como sacáridos preparados de manera sintética. La inulina es un fructano que contiene hasta 100 unidades de fructosa, así como una unidad final de glucosa. Los fructooligosacáridos y galactooligosacáridos comprenden exclusivamente unidades de fructosa o galactosa (por lo general, hasta 10) y, en el caso de polidextrosa, se trata de un polisacárido sintético de unidades de glucosa, sorbita y ácido cítrico.

35 Además, es preferible que el complemento alimenticio comprenda como componente adicional al menos una sal soluble de calcio. De esta forma, se garantiza que el consumidor recibe al mismo tiempo un aporte suficiente de calcio, independientemente de sus hábitos nutricionales habituales.

En principio, se toman en consideración todas las sales solubles de calcio que son atóxicas y que carecen de otras acciones inconvenientes. Preferiblemente, la al menos una sal soluble de calcio se selecciona de citrato de calcio, lactato de calcio, gluconato de calcio, lactato gluconato de calcio, lactobionato de calcio y sus mezclas.

40 El complemento alimenticio según la invención puede contener también, como preparado de combinación, otros componentes adicionales que ejercen una acción positiva sobre la salud del tejido óseo o que, en general, son útiles para completar la nutrición. Por ejemplo, es especialmente beneficioso que el complemento alimenticio comprenda además una o múltiples vitaminas seleccionadas de vitamina C, vitamina D, vitamina D₃, vitamina E, vitamina K y sus metabolitos.

45 Adicionalmente, el complemento alimenticio según la invención se puede suplementar con diversas sustancias minerales tales como, en especial, sales de flúor, potasio y magnesio. La absorción de estos minerales a través de la pared intestinal se puede reforzar además por medio de ácidos grasos de cadena corta.

Los ácidos grasos omega-3 representan una suplementación adicional conveniente, que puede dar lugar a un incremento del contenido de calcitonina en el tejido óseo. Se les atribuye también una acción antiinflamatoria.

Es posible que las isoflavonas de soja tengan también un efecto positivo sobre la densidad ósea y se les puede incluir en el complemento alimenticio según la invención

- 5 Por último, cabe mencionar también especias o sus componentes tales como, por ejemplo, curcumina y chile que, con sus acciones antiinflamatorias e inmunomoduladoras pueden contribuir al efecto beneficioso del complemento alimenticio según la invención.

10 A través del efecto positivo del hidrolizado de colágeno según la invención sobre la salud ósea, su administración como complemento alimenticio permite, bajo determinadas circunstancias, renunciar o al menos reducir la dosis de medicamentos que se utilizan con esta finalidad, sobre todo para la prevención y/o el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica. Ejemplos de estas sustancias farmacéuticas, cuya administración en parte no carece de problemas, son moduladores selectivos de receptores de estrógeno (SERM), parathormona y su análogo teriparatida, otras hormonas (en especial, estrógenos y hormona del crecimiento), bisfosfonatos y anticuerpos monoclonales.

15 Un objeto adicional de la invención es un procedimiento para la preparación del hidrolizado de colágeno según la invención, que comprende las etapas de:

- Preparación de una solución acuosa de gelatina ósea de tipo B con una concentración de 5 a 20% en peso, en especial, de aproximadamente 10% en peso;
- 20 - Adición de una endoproteasa neutra de *Bacillus subtilis* en una cantidad de 1 a 4% en peso, en especial de aproximadamente 2% en peso con respecto a la cantidad de gelatina;
- Dejar actuar la endoproteasa sobre la gelatina, a una temperatura de 40 a 60°C, en especial de aproximadamente 50°C, y a un valor de pH de 5,5 a 6,5, en especial de aproximadamente 6, durante un periodo de tiempo de 20 a 40 min, en especial durante aproximadamente 30 min; e
- 25 - Inactivación térmica de la endoproteasa.

Ya se han descrito las ventajas especiales y realizaciones preferidas del procedimiento según la invención en relación con el hidrolizado de colágeno según la invención.

30 Los siguientes ejemplos tienen como objetivo explicar más detalladamente la invención, haciendo referencia a las figuras.

Muestran de manera individual:

Figura 1: Cromatograma de permeación en gel, con la distribución del peso molecular de un hidrolizado de colágeno según la invención y de un hidrolizado de comparación;

35 Figura 2: Diagrama relativo a la estimulación de la síntesis de colágeno de tipo I y osteocalcina mediante un hidrolizado de colágeno según la invención y un hidrolizado de comparación;

Figura 3: Diagrama relativo a la estimulación de la síntesis de diversas proteínas de la matriz y enzimas mediante un hidrolizado de colágeno según la invención y cuatro hidrolizados de comparación diferentes.

Preparación de los hidrolizados de colágeno

40 A continuación, se describe la preparación de un hidrolizado de colágeno según la presente invención (Ejemplo), así como de cuatro hidrolizados de colágeno que no corresponden a la invención (Ejemplos comparativos 1 a 4).

Como materiales de partida se utilizaron dos gelatinas diferentes, a saber una gelatina de tipo B, procedente de tejido óseo bovino (designada en lo sucesivo gelatina ósea) y una gelatina de piel de cerdo de tipo A. En la Tabla 1 se muestran sus parámetros básicos.

45

Tabla 1

	Gelatina ósea	Gelatina de piel de cerdo
Resistencia a la eflorescencia	298 g	299 g
Viscosidad (6,67% en peso, 60°C)	5,52 mPa·s	3,90 mPa·s
Conductividad (1% en peso, 30°C)	111 µS/cm	157 µS/cm
Humedad	10,7%	9,6%
Punto isoeléctrico	5,04	9,16
Grado de amidación	6,7%	31,7%

Ejemplo

- 5 En 1.800 g de agua destilada, se hincharon 200 g de gelatina ósea durante 30 min a temperatura ambiente. Agitando, la gelatina pre-hinchada se calentó y disolvió a $58 \pm 2^\circ\text{C}$. El valor de pH se ajustó a $6,0 \pm 0,2$ con sosa cáustica. Seguidamente, se agregaron 2% en peso (con respecto a la gelatina) de una endoproteasa neutra de *Bacillus subtilis*. Después de un periodo de hidrólisis de 30 min, la solución se calentó a 85°C para inactivar la enzima. La solución se secó para obtener el hidrolizado de colágeno formado.

Ejemplo comparativo 1

- 10 En 1.800 g de agua destilada, se hincharon 200 g de gelatina ósea durante 30 min a temperatura ambiente. Agitando, la gelatina pre-hinchada se calentó y disolvió a $49 \pm 2^\circ\text{C}$ y, a continuación, se agregaron 1,64 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. El valor de pH se ajustó a $6,0 \pm 0,2$ con sosa cáustica. Seguidamente, se agregaron 0,6% en peso (con respecto a la gelatina) de una endoproteasa neutra de *Bacillus subtilis*. Después de un periodo de hidrólisis de 30 min, se agregan 0,2% en peso (con respecto a la gelatina) de una endoproteasa neutra de *Bacillus amyloliquefaciens*. Después de una hidrólisis de 180 min de duración total, la solución se calentó a 85°C para inactivar la enzima y, seguidamente, se secó.

Ejemplo comparativo 2

- 20 En 1.800 g de agua destilada, se hincharon 200 g de gelatina ósea durante 30 min a temperatura ambiente. Agitando, la gelatina pre-hinchada se calentó y disolvió a $49 \pm 2^\circ\text{C}$ y, a continuación, se agregaron 0,4 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. El pH se ajustó a $6,5 \pm 0,2$ con sosa cáustica. Seguidamente, se agregaron 0,6% en peso (con respecto a la gelatina) de una endoproteasa neutra de *Bacillus subtilis*. Después de un periodo de hidrólisis de 60 min, se agregaron 0,2% en peso (con respecto a la gelatina) de una exoproteasa de *Aspergillus sojae*. Después de un periodo total de 7 h de hidrólisis, la solución se calentó a 85°C para inactivar la enzima y, seguidamente, se secó.

Ejemplo comparativo 3

- 25 En 1.800 g de agua destilada, se hincharon 200 g de gelatina de piel de cerdo durante 30 min a temperatura ambiente. Agitando, la gelatina pre-hinchada se calentó y disolvió a $57 \pm 2^\circ\text{C}$. El valor de pH se ajustó a $6,0 \pm 0,2$ con sosa cáustica. Seguidamente, se agregaron 0,3% en peso (con respecto a la gelatina) de una endoproteasa neutra de *Bacillus subtilis*. Después de 180 min, la solución se calentó a 85°C para inactivar la enzima y, seguidamente, se secó.

- 30 Ejemplo comparativo 4

- 35 En 1.800 g de agua destilada, se hincharon 200 g de gelatina de piel de cerdo durante 30 min a temperatura ambiente. Agitando, la gelatina pre-hinchada se calentó y disolvió a $58 \pm 2^\circ\text{C}$. El valor de pH se ajustó a $7,0 \pm 0,2$ con sosa cáustica. Seguidamente, se agregaron 2% en peso (con respecto a la gelatina) de una endoproteasa alcalina de *Bacillus licheniformis*. Después de 180 min, la solución se calentó a 85°C para inactivar la enzima y, seguidamente, se secó.

Determinación de la distribución del peso molecular

La distribución del peso molecular de los péptidos de los diferentes hidrolizados de colágeno se determinó por cromatografía de permeación en gel, usando los parámetros siguientes:

Fase estacionaria: TSK 2000 SW XL (Tosoh Bioscience GmbH)

Fase móvil: 0,4 mol/L de dihidrógeno-fosfato sódico, a pH 5,3

Caudal: 0,5 mL/min

Estándar de calibración: Fragmentos definidos de colágeno de tipo I (FILK, Freiberg)

5 Detección: Detector UV Knauer K-2501 a 214 nm

En la Tabla 2 se indican, respectivamente, la distribución del peso molecular según factores de peso preestablecidos, el peso molecular medio, la viscosidad y el valor de pH (siempre a 20% en peso y 25°C), así como el grado de amidación de los diferentes hidrolizados de colágeno.

Tabla 2.

Fracciones	Ejemplo	Ej. Comp. 1	Ej. Comp. 2	Ej. Comp. 3	Ej. Comp. 4
>18 kDa	4,3	0,1	0	0,8	0
13,5 – 18 kDa	2,9	0,2	0,1	2,0	0
7,5 – 13,5 kDa	21,1	5,0	0,7	20,6	0
3,5 – 7,5 kDa	29,8	25,4	10,6	25,8	0,9
1,5 – 3,5 kDa	24,5	34,6	24,3	22,8	10,9
0,5 – 1,5 kDa	15,1	31,0	46,4	20,5	70,9
<0,5 kDa	2,4	3,7	18,0	7,4	17,4
PM medio	5.800 Da	2.900 Da	1.800 Da	4.700 Da	950 Da
Viscosidad	6,77 mPa·s	4,15 mPa·s	3,22 mPa·s	5,61 mPa·s	2,45 mPa·s
Valor de pH	6,2	6,1	6,4	6,0	6,5
Grado de amidación	6,8%	n.d.	n.d.	n.d.	27,6%

10

La Figura 1 muestra el cromatograma de permeación en gel con la distribución del peso molecular del hidrolizado de colágeno según la invención de acuerdo con el ejemplo y del hidrolizado de colágeno según el Ejemplo comparativo 4. El peso molecular está representado en la abscisa en una escala logarítmica.

Estimulación de la síntesis de proteínas de la matriz y enzimas *in vitro*

15 Para confirmar la eficacia especial del hidrolizado de colágeno según la invención, se estudió *in vitro* su acción estimulante sobre la síntesis de proteínas de la matriz y enzimas, que llevan a cabo una función en la formación y la mineralización de la matriz, por medio de los osteoblastos. Este análisis se efectuó determinando la expresión del correspondiente ARNm por PCR en tiempo real y una evaluación semicuantitativa (con respecto a los controles sin hidrolizado de colágeno).

20 Los osteoblastos humanos se aislaron de articulaciones de rodilla, incubando material óseo bajo agitación intensa a 37°C durante 1 h en solución de Hanks suplementado con 7 mg/mL de hialuronidasa de tipos I y III-S y 5 mg/mL de pronasa. A continuación, se prosiguió la digestión a 37°C durante 3 a 5 h en solución de Hanks suplementada con 16 mg/mL de colagenasa de tipo CLS IV. Después de la digestión enzimática, los osteoblastos primarios se cultivaron en Medio HAMS F12 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 20 U/mL de penicilina-estreptomicina, 25 50 µg/mL de partricina, 0,05 mg/mL de ácido ascórbico y 0,15 mg/mL de glutamina.

Para la investigación propiamente dicha, se incubaron cultivos celulares en monocapa de los osteoblastos humanos durante un periodo de 24 h en un medio suplementado con 0,5 mg/mL del correspondiente hidrolizado de colágeno (según el ejemplo o uno de los ejemplos comparativos). En el medio se incubó un control correspondiente, sin hidrolizado. A continuación, se llevó a cabo la determinación de la expresión del ARNm correspondiente de la forma descrita anteriormente.

30

5 Los resultados de la estimulación de la síntesis de colágeno de tipo I y osteocalcina se representan en forma de un diagrama de columnas en la Figura 2, en donde la columna izquierda representa en todos los casos el ejemplo según la invención y la columna derecha, el Ejemplo comparativo 4. En la ordenada, se indica la expresión de ARNm con respecto al control (= 1) (valor medio y desviaciones estándares de al menos 12 ensayos independientes). Aunque el colágeno de tipo I es, con diferencia, la proteína de matriz más importante del material óseo, la expresión reforzada de osteocalcina, una enzima que interviene en la diferenciación de la matriz, favorece también la formación de la matriz.

10 En ambos casos, se observa un efecto claramente estimulante del hidrolizado según la invención, a saber, un aumento de la expresión del ARNm de colágeno con un factor medio de aproximadamente 2,7 y de la expresión del ARNm de osteocalcina, con un factor medio de aproximadamente 2,0. Es interesante destacar que el hidrolizado según el Ejemplo comparativo 4, preparado con un material de partida diferente y que exhibe un peso molecular medio más bajo, provocó, por el contrario, incluso una reducción de la expresión de ambos ARNm, lo cual pone de manifiesto la elevada especificidad del hidrolizado de colágeno según la invención.

15 Los resultados correspondientes para la estimulación de la síntesis de colágeno de tipo I, biglicano, versicano y fosfatasa alcalina están representados en un diagrama de columnas en la Figura 3, en donde las columnas indican, de izquierda a derecha, el ejemplo según la invención y los Ejemplos comparativos 1, 2 y 3, respectivamente (valor medio y desviación estándar de al menos 12 ensayos independientes). El biglicano y versicano son proteoglicanos que intervienen en la organización estructural de la matriz ósea. La fosfatasa alcalina, además de otras funciones, participa, al igual que la osteocalcina, en la diferenciación de la matriz ósea.

20 También en este caso se ve para las cuatro proteínas que el hidrolizado de colágeno según la invención desarrolla una acción más eficaz que todos los ejemplos comparativos. De estos últimos, tan sólo el Ejemplo comparativo 3 muestra un efecto ligeramente estimulante sobre la síntesis de colágeno de tipo I (factor de aproximadamente 1,3), en tanto que en todos los casos restantes, el efecto observado es nulo o, incluso, negativo, es decir, se produce una reducción de la síntesis de ARNm. En relación con biglicano, versicano y la fosfatasa alcalina, la acción del hidrolizado de colágeno según la invención también es relativamente débil, pero, no obstante, siempre más positiva
25 que la de los otros hidrolizados.

La eficacia mejorada del hidrolizado de colágeno según la invención con respecto a otros hidrolizados diferentes se confirma igualmente en relación con todas las proteínas de la matriz y enzimas estudiadas, cuya expresión potenciada favorece la formación de la matriz ósea.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Hidrolizado de colágeno, preparado por hidrólisis enzimática de gelatina ósea de tipo B, en donde el hidrolizado de colágeno está formado por péptidos, de los cuales al menos 50% en peso, en particular, al menos 70% en peso, tienen un peso molecular de 1.500 a 13.500 Da y cuyo peso molecular medio se encuentra en el intervalo de 4.500 a 6.000 Da.
2. Hidrolizado de colágeno según la reivindicación 1, en donde la gelatina ósea se prepara por digestión alcalina del colágeno del tejido óseo de animales vertebrados, en especial, de oseína.
3. Hidrolizado de colágeno según una de las reivindicaciones anteriores, en donde la gelatina ósea tiene un punto isoeléctrico menor que 5,5.
- 10 4. Hidrolizado de colágeno según una de las reivindicaciones anteriores, en el que los péptidos tienen un grado de amidación de los restos de glutamina o ácido glutámico y de los restos de asparagina o ácido aspártico, por lo general, menor de 15%, en especial, menor de 10%.
5. Hidrolizado de colágeno según una de las reivindicaciones anteriores, en el que una solución acuosa al 20% en peso del hidrolizado de colágeno a 25°C, tiene una viscosidad mayor que 5 mPa·s, en particular, mayor que 6 mPa·s.
- 15 6. Hidrolizado de colágeno según una de las reivindicaciones anteriores, en donde el hidrolizado de colágeno tiene un contenido de, respectivamente, amonio, sulfato y fosfato menor de 300 ppm, en especial, menor de 100 ppm.
7. Hidrolizado de colágeno según una de las reivindicaciones anteriores, en donde el hidrolizado de colágeno se prepara por hidrólisis de la gelatina con una endoproteasa neutra de *Bacillus subtilis*.
- 20 8. Hidrolizado de colágeno según la reivindicación 7, en donde el hidrolizado de colágeno se prepara bajo la acción de la endoproteasa a una temperatura de 40 a 60°C, en especial, aproximadamente 50°C, durante un periodo de tiempo de 20 a 40 min, en especial, aproximadamente 30 min.
9. Hidrolizado de colágeno según una de las reivindicaciones anteriores, para usar como principio activo para la conservación y/o la mejoría de la salud del tejido óseo, en especial, para la prevención y/o el tratamiento de la osteoporosis.
- 25 10. Hidrolizado de colágeno para utilizar según la reivindicación 9 como principio activo para la prevención y/o el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica.
11. Hidrolizado de colágeno para utilizar según las reivindicaciones 9 o 10, en donde el hidrolizado de colágeno está formulado como complemento alimenticio, especialmente en forma de polvo, granulado, una solución o una suspensión, o en forma de comprimidos, cápsulas, pastillas o sobres.
- 30 12. Hidrolizado de colágeno para utilizar según la reivindicación 11, en donde se prevé una toma diaria por vía oral de 1 a 15 g del hidrolizado de colágeno, preferiblemente de 2 a 10 g, más preferiblemente, de 2 a 7 g y, en especial, de 2,5 a 5 g.
- 35 13. Complemento alimenticio que comprende el hidrolizado de colágeno según una de las reivindicaciones anteriores y uno o múltiples prebióticos seleccionados preferiblemente de oligo- y/o polisacáridos, en particular de inulina, fructanos, galactooligosacáridos (GOS), fructooligosacáridos (FOS), maltodextrinas resistentes, polidextrosa y sus mezclas.
- 40 14. Complemento alimenticio según la reivindicación 13 que comprende, adicionalmente, (i) una o múltiples sales solubles de calcio seleccionadas principalmente de citrato de calcio, lactato de calcio, lactato gluconato de calcio, lactobionato de calcio y sus mezclas; y/o (ii) una o múltiples vitaminas, seleccionadas de vitamina C, vitamina D, vitamina D₃, vitamina E, vitamina K y sus metabolitos, y/o (iii) una o múltiples sustancias minerales, seleccionadas de sales de flúor, potasio y magnesio.
15. Procedimiento para la preparación de un hidrolizado de colágeno según una de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende las etapas de:
 - 45 - preparación de una solución acuosa de gelatina ósea de tipo B, con una concentración de 5 a 20% en peso, en particular, de aproximadamente 10% en peso;
 - adición de una endoproteasa neutra de *Bacillus subtilis* en una cantidad de 1 a 4% en peso, en especial, de aproximadamente 2% en peso con respecto a la gelatina;
 - 50 - dejar actuar la endoproteasa sobre la gelatina a una temperatura de 40 a 60°C, en especial, de aproximadamente 50°C, y a un valor de pH de 5,5 a 6,5, en particular, de aproximadamente 6, durante un periodo de tiempo de 20 a 40 min, en especial, durante aproximadamente 30 min; e
 - inactivación térmica de la endoproteasa.

FIG.1

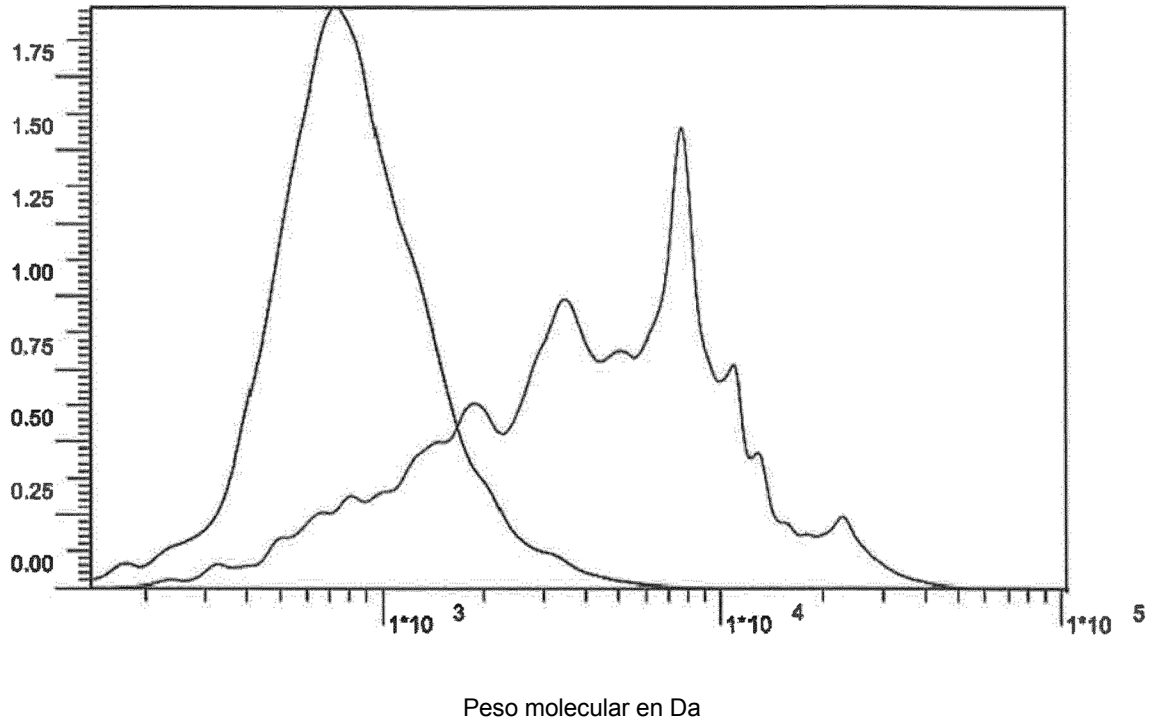


FIG.2

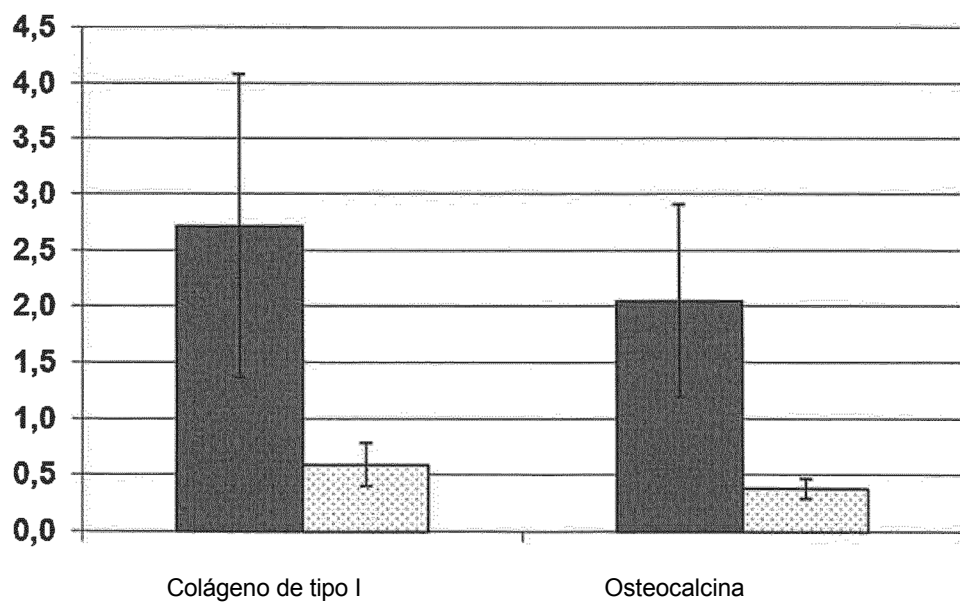


FIG.3

