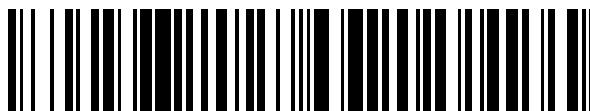


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 922**

51 Int. Cl.:

<b>A61Q 3/00</b>	(2006.01)
<b>A61Q 5/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/39</b>	(2006.01)
<b>A23L 33/18</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/65</b>	(2006.01)
<b>A61Q 19/08</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2011 PCT/EP2011/067028**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12065782**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2011 E 11764723 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2640352**

54 Título: **Hidrolizado de colágeno usado para mejorar la salud de la piel, pelo y/o uñas humanos**

30 Prioridad:

**15.11.2010 DE 102010060564**

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

**14.11.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 641 922 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 usado para mejorar la salud de la piel, pelo y/o uñas humanos

5 La presente invención se refiere a la utilización de hidrolizado de colágeno para estimular la biosíntesis de proteínas de matriz extracelular por células de la piel, con el fin de aumentar la tonicidad de la piel, de reducir la formación de arrugas y/o de aumentar el contenido en humedad de la piel.

10 Desde hace algún tiempo se sabe que mediante la toma oral de hidrolizado de colágeno pueden lograrse en los humanos efectos ventajosos en relación con la salud de la piel, pero también del pelo y/o las uñas (véase, por ejemplo, Vivian Zague: "A new view concerning the effects of collagen hydrolysate intake on skin properties" en *Arch. Dermatol. Res.* 2008 (9) 479-483). En este contexto, se entiende por una mejora de la salud de la piel cualquier influencia positiva en las propiedades y funciones naturales de la piel, pudiendo estas propiedades y funciones verse mermadas tanto a consecuencia del envejecimiento como también, además, por diferentes influencias ambientales negativas. La toma de hidrolizado de colágeno repercute también ventajosamente en las propiedades del pelo y/o de las uñas.

15 El documento US 4,130,555 da a conocer una mezcla de péptidos que se produce mediante hidrólisis de un material o una gelatina con contenido en colágeno y que presenta una distribución de pesos moleculares relativamente estrecha.

El documento DE 42 44 418 A1 da a conocer preparados peptídicos y procedimientos para su preparación, preferiblemente mediante hidrólisis parcial de tejido conjuntivo, colágeno, elastina y queratina, que contienen tripéptidos o secuencias peptídicas Gly-His-Lys y/o Gly-Asp-Ser.

20 El documento EP 0 120 722 A1 da a conocer un procedimiento para estimular la multiplicación de células, especialmente de fibroblastos, mediante la acción de péptidos o polipéptidos, en donde los péptidos o polipéptidos se encapsulan en una fase lipídica hidratada.

25 El documento FR 2 900 155 A1 da a conocer un hidrolizado de cartílago con una proporción de un 45 a un 70% en peso de colágeno hidrolizado de tipo II, estando el peso molecular medio de la fracción peptídica entre 500 y 1.000 Dalton.

En un artículo de J. Huo y Z. Zhao en *Agricultural Sciences in China* 2009 (8) 723-729 se describe la hidrólisis enzimática de colágeno procedente de la piel de bacalao (*Gadus morrhua*) y su distribución de pesos moleculares.

El documento CN 101 518 645 da a conocer un producto de péptidos de colágeno marino y su aplicación terapéutica para mejorar la función renal.

30 El folleto "Peptan - The perfect protein for a healthy lifestyle" de la Firma Rousselot describe hidrolizados de colágeno de cerdos, bovinos y peces y su efecto ventajoso en el aspecto de la piel.

En un artículo de G. Zhang et al. en *Food Hydrocolloids* 2009 (23) 2001-2007 se describe la investigación de péptidos marcadores en hidrolizados de colágeno obtenidos mediante hidrólisis de gelatina bovina y porcina con tripsina.

35 La invención tiene el objetivo de aumentar aún más los efectos positivos del hidrolizado de colágeno en la salud de la piel, el pelo y/o las uñas y proponer un hidrolizado de colágeno particularmente eficaz para este uso.

Este objetivo se logra mediante la utilización no terapéutica de un hidrolizado de colágeno según la reivindicación 1.

40 Los hidrolizados de colágeno contienen péptidos con diferentes longitudes de cadena o pesos moleculares, que se producen con la disociación de las cadenas de proteína del colágeno, pudiendo diferenciarse claramente las distribuciones de pesos moleculares de estos péptidos en función de las condiciones de preparación del hidrolizado. Se ha comprobado ahora sorprendentemente que un hidrolizado de colágeno con las características anteriormente mencionadas repercute muy ventajosamente en la salud de la piel bajo distintos puntos de vista, es decir que muestra resultados claramente mejores que los hidrolizados de colágeno empleados hasta ahora, que contienen una proporción mucho menor de péptidos de bajo peso molecular y/o que no contienen los péptidos característicos.

45 La distribución de pesos moleculares del hidrolizado de colágeno puede determinarse de una forma muy exacta y reproducible por ejemplo mediante una cromatografía por permeación de gel, utilizando un estándar de calibración consistente en fragmentos de colágeno definidos.

50 Al menos un 45% en peso del hidrolizado de colágeno presenta un peso molecular de menos de 1.500 Da, es decir que cierta proporción de los péptidos del hidrolizado de colágeno es de cadena muy corta. Se ha comprobado que mediante tales proporciones de muy bajo peso molecular, que en los hidrolizados de colágeno utilizados actualmente están contenidas sólo en una cantidad mucho menor, es posible lograr marcados efectos en la salud de piel.

El peso molecular medio (peso medio  $M_w$ ) del hidrolizado de colágeno utilizado según la invención está típicamente dentro de un intervalo de aproximadamente 1.700 a aproximadamente 2.300 Da.

La presencia de los péptidos característicos del hidrolizado de colágeno, que de un modo interesante contribuyen considerablemente a su eficacia, puede determinarse en particular mediante una espectroscopia de masas MALDI, apareciendo los péptidos característicos en el espectro de masas como picos. Los al menos cuatro péptidos característicos presentan, en una distribución de pesos moleculares determinada mediante espectroscopia de masas MALDI, una intensidad al menos doble, y con mayor preferencia una intensidad al menos cuádruple, en comparación con su entorno.

En una forma de realización preferida de la invención, el hidrolizado de colágeno comprende un péptido entre 620 y 690 Da, un péptido entre 790 y 860 Da, un péptido entre 980 y 1.050 Da y un péptido entre 1.175 y 1.245 Da. Estos péptidos distinguen de un modo característico el hidrolizado de colágeno según la invención de los hidrolizados de colágeno conocidos.

El hidrolizado de colágeno puede presentar adicionalmente también péptidos característicos entre 1.500 y 3.500 Da, que también constituyen una característica diferenciadora con respecto a los hidrolizados de colágeno según el estado actual de la técnica.

El hidrolizado de colágeno presenta preferiblemente una proporción de hidroxiprolina de un 12% en peso o más. El aminoácido hidroxiprolina, formado mediante una hidroxilación postraducciona de prolina, se presenta exclusivamente en el colágeno, de manera que una gran proporción de hidroxiprolina en el hidrolizado de colágeno constituye una medida de la ausencia considerable de otras proteínas del tejido conjuntivo (por ejemplo elastina y proteoglicanos), cuyos fragmentos pueden estar contenidos también en ciertas cantidades en los hidrolizados de colágeno en función del procedimiento de preparación.

Resulta favorable que el hidrolizado de colágeno esté preparado mediante una hidrólisis enzimática de gelatina. La gelatina comprende colágeno desnaturalizado y se obtiene mediante distintos procedimientos, conocidos por el experto en la técnica, a partir del tejido conjuntivo o a partir de los huesos de diferentes especies animales. En el marco de la presente invención, la gelatina empleada como material de partida para el hidrolizado de colágeno se obtiene preferiblemente de la piel de mamíferos, especialmente de cerdo o de bovino, no excluyéndose sin embargo la utilización de gelatina de aves de corral.

La hidrólisis enzimática de la gelatina se realiza mediante al menos una endoproteasa, estando previsto en el marco de la invención emplear varias endoproteasas (es decir al menos dos endoproteasas diferentes), para así influir correspondientemente en el perfil de aminoácidos del hidrolizado de colágeno resultante y aumentar el efecto positivo del hidrolizado en la salud de la piel, el pelo y/o las uñas.

Según la invención, el hidrolizado de colágeno está preparado mediante la acción sucesiva de al menos dos endoproteasas con una especificidad diferente, o sea de al menos dos metaloproteasas y/o serinoproteasas diferentes, es decir de proteasas que disocian la secuencia de aminoácidos de las moléculas de colágeno en cada caso antes o después de determinados aminoácidos. En el caso de las metaloproteasas y/o las serinoproteasas se trata de enzimas procedentes de los microorganismos *Bacillus subtilis* o *Bacillus amyloliquefaciens* o de *Bacillus licheniformis*.

Mediante la elección de endoproteasas adecuadas no sólo es posible obtener la distribución de pesos moleculares característica del hidrolizado de colágeno, sino que también se influye en el tipo de los aminoácidos en los extremos de los péptidos contenidos en el hidrolizado. A este respecto es preferible, por ejemplo, que al menos un 50% de los aminoácidos N-terminales del hidrolizado de colágeno sean aminoácidos hidrófobos, en particular alanina, leucina e isoleucina.

La invención se refiere en particular también a la utilización no terapéutica del hidrolizado de colágeno para estimular la biosíntesis de proteínas de matriz extracelular por células de la piel. Las células de la piel comprenden en particular fibroblastos, que, entre otras cosas, sintetizan colágeno (principalmente de tipo I), elastina y proteoglicanos. La formación de estas proteínas en cantidad suficiente es decisiva para la construcción o la regeneración de la matriz extracelular de la piel, que a su vez es esencialmente determinante para las propiedades de la piel, como la tonicidad y la elasticidad, así como su balance hídrico.

Entre las células de la piel se incluyen también los queratinocitos, que son responsables tanto de la cornificación de la capa exterior de la piel como de la formación de pelo y uñas. Así pues, una estimulación de estas células mediante el hidrolizado de colágeno utilizado según la invención puede conseguir una mejora de la función barrera de la piel, así como de la salud del pelo y/o las uñas.

Un aspecto esencial de la invención se refiere a la utilización no terapéutica del hidrolizado de colágeno para aumentar la tonicidad de la piel y/o para disminuir la formación de arrugas. Por regla general, estas propiedades de la piel se deterioran a causa de la edad y a causa de influencias ambientales como, por ejemplo, la radiación UV o sustancias tóxicas. Dado que de la tonicidad y la elasticidad de la piel son responsables especialmente las proteínas de matriz colágeno y elastina, una síntesis aumentada de las mismas, que se estimula muy especialmente mediante

el hidrolizado de colágeno utilizado según la invención, permite contrarrestar estos efectos y mejorar claramente la salud de la piel.

5 Otro aspecto importante de la invención se refiere a la utilización no terapéutica del hidrolizado de colágeno para aumentar el contenido en humedad de la piel. Los proteoglucanos (por ejemplo versicano, biglucano y decorina) contenidos en la matriz extracelular, cuya síntesis se estimula también de forma demostrable mediante el hidrolizado de colágeno utilizado según la invención, contribuyen considerablemente a la capacidad de la piel para fijar cantidades suficientes de humedad. El contenido en humedad de la piel también puede verse reducido por influencias ambientales perjudiciales, como la radiación UV, yendo la pérdida de humedad acompañada frecuentemente de una menor flexibilidad, una tendencia a agrietarse y una cornificación excesiva de la piel.

10 Otro aspecto de la invención se refiere al hidrolizado de colágeno para la utilización terapéutica con el fin de mejorar la función barrera de la piel. Para esta función barrera desempeñan un papel esencial las, así llamadas, proteínas CE (proteínas "Cornified Envelope"), entre otras involucrina, loricrina y filagrina, cuya biosíntesis se estimula de forma demostrable mediante el hidrolizado de colágeno de bajo peso molecular. Así pues, mediante la utilización según la invención de hidrolizado de colágeno se mejoran la disminución de la pérdida de humedad, la función barrera y la protección natural de la piel contra gérmenes patógenos y sustancias tóxicas.

15 La utilización según la invención del hidrolizado de colágeno tiene adicionalmente un efecto antioxidante en la zona de la piel, con lo que es posible reducir la frecuencia de daños en el ADN (mutaciones), por ejemplo debido a radiación UV o sustancias mutágenas. Tales mutaciones constituyen una de las causas del envejecimiento prematuro de las células y favorecen así los fenómenos de envejecimiento de la piel (disminución de la tonicidad, formación de arrugas, etc.), de manera que este proceso puede inhibirse mediante la utilización según la invención.

20 Según una forma de realización preferida de la invención, el hidrolizado de colágeno está previsto para una toma oral. Con la toma oral se consigue frecuentemente un transporte del hidrolizado de colágeno a través de la circulación sanguínea hacia el lugar de acción, es decir en particular hacia las células de la piel, más eficaz que en el caso de un uso tópico. Además, por regla general, esta forma de uso está asociada con un esfuerzo considerablemente menor para el usuario.

25 El hidrolizado de colágeno se emplea preferiblemente como complemento alimenticio. En este contexto, el hidrolizado de colágeno sirve, por regla general, para mejorar la salud de la piel en el sentido de una medida sanitaria preventiva general o también de un uso cosmético; tales complementos alimenticios pueden denominarse "nutracéuticos" o "nitricosméticos". Sin embargo, en el marco de la presente invención también es posible utilizar el hidrolizado de colágeno para el tratamiento de un cuadro clínico, por ejemplo en caso de presencia de una dermatitis atópica, en la que los pacientes tienen una tendencia elevada a una piel seca y agrietada.

El complemento alimenticio puede ofrecerse en casi cualquier forma, por ejemplo en forma de comprimidos, cápsulas, grageas, pastillas o también de una solución (por ejemplo en ampollas individuales o en bebidas).

35 Como alternativa, el hidrolizado de colágeno puede también estar contenido en un alimento o estimulante, por ejemplo en dulces o en un polvo instantáneo para la preparación de bebidas. De este modo, el usuario puede tomar el hidrolizado sin un esfuerzo adicional, en el marco de la alimentación normal (así llamada "Functional Food"). En este contexto resulta particularmente ventajoso que el hidrolizado de colágeno sea en esencia de sabor neutro.

40 Resulta favorable prever una toma diaria de aproximadamente 1,5 a 5 g, preferiblemente de aproximadamente 2 a 3 g, más preferiblemente de aproximadamente 2,3 a 2,7 g, del hidrolizado de colágeno. Se ha comprobado que mediante la toma oral de esta cantidad de hidrolizado es posible mejorar perceptiblemente la salud de la piel ya en un plazo de unas semanas.

45 Otra forma de realización de la invención se refiere al uso tópico del hidrolizado de colágeno, es decir el uso en forma de productos cosméticos para aplicar sobre la piel, el pelo y/o las uñas. En este contexto, el hidrolizado de colágeno puede estar contenido en particular en una crema, una pomada, una loción o un gel. También resulta favorable añadir el hidrolizado de colágeno a un producto para el aseo personal, como por ejemplo un gel de ducha o un champú, por ejemplo en una cantidad de aproximadamente un 5 a un 10% en peso.

Por medio de los ejemplos siguientes, haciendo referencia a las figuras, se describen más detalladamente ésta y otras ventajas de la invención. Se muestran en concreto:

- 50 Figuras 1A a 1C: diagramas relativos a la estimulación de la síntesis de colágeno de tipo I, biglucano o versicano;
- Figuras 2A y 2B: diagramas relativos al aumento de la humedad de la piel en ratones sin pelo;
- Figura 3: un diagrama relativo a la estimulación de la síntesis de proteínas CE;
- Figuras 4A a 4C: espectros de masa MALDI de diferentes hidrolizados de colágeno; y

Figuras 5A a 5B: diagramas relativos a la estimulación de la síntesis de colágeno tipo I, decorina y versicano.

**Ejemplos**

1. Preparación y características del hidrolizado de colágeno

5 Para preparar un hidrolizado de colágeno según la invención se emplea como material de partida una solución acuosa de una gelatina de corteza de tocino de cerdo (tipo A, 200 a 250 g Bloom) con una concentración de un 20 a un 40% en peso (materia seca). La gelatina se hidroliza enzimáticamente mediante la acción sucesiva de dos endoproteasas diferentes de origen microbiano a una temperatura de 50 a 60 °C, durante 120 a 180 min, utilizándose como primera enzima una endoproteasa de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus amyloliquefaciens* y como  
10 segunda enzima una endoproteasa de *Bacillus licheniformis*. A continuación se inactivan las enzimas térmicamente y se seca la solución por pulverización.

La distribución de pesos moleculares del hidrolizado de colágeno resultante puede determinarse mediante cromatografía por permeación de gel, utilizando los siguientes parámetros:

- Fase estacionaria: TSK 2000 SW XL (Tosoh Bioscience GmbH)
- 15 Fase móvil: 0,4 mol/l de dihidrogenofosfato de sodio pH 5,3
- Flujo: 0,5 ml/min
- Estándar de calibración: fragmentos de colágeno tipo I definidos (FILK, Freiberg)
- Detección: detector UV Knauer K-2501 a 214 nm

20 La determinación dio como resultado una distribución de pesos moleculares del hidrolizado de colágeno según la invención (en lo que sigue denominado hidrolizado de bajo peso molecular) de acuerdo con la tabla 1 siguiente. Con fines de comparación se indica en la tabla 1 también la distribución de pesos moleculares de un hidrolizado de colágeno comercialmente disponible, determinada con el mismo método (en lo que sigue denominado hidrolizado de alto peso molecular):

Tabla 1

Intervalo MW	Hidrolizado de bajo peso molecular	Hidrolizado de alto peso molecular
> 7.500 Da	< 5% en peso	< 10% en peso
3.500 - 7.500 Da	aprox. 12-18% en peso	aprox. 25-35% en peso
1.500 - 3.500 Da	aprox. 25-31% en peso	aprox. 29-35% en peso
500 - 1.500 Da	aprox. 40-46% en peso	aprox. 24-30% en peso
< 500 Da	aprox. 5-10% en peso	aprox. 2-5% en peso

25 El contenido en hidroxiprolina de este hidrolizado de bajo peso molecular es de aproximadamente un 12 a un 13% en peso y puede determinarse por fotometría tras una oxidación con cloramina T y una reacción con p-dimetilamino-benzaldehído. Más de un 50% de los aminoácidos N-terminales del hidrolizado son aminoácidos hidrófobos, en particular alanina, leucina e isoleucina.

30 2. Estimulación de la síntesis de proteínas de matriz extracelular

La estimulación de la síntesis de colágeno (tipo I) y de los proteoglucanos biglucano y versicano se investigó *in vitro* en fibroblastos dérmicos humanos (células de la piel). Para ello se incubaron las células durante 24 horas con, en cada caso, 0,5 mg/ml del hidrolizado de bajo peso molecular o del hidrolizado de alto peso molecular y, a continuación, la expresión de ARN de colágeno, ARN de biglucano y ARN de versicano se determinó mediante PCR  
35 en tiempo real y se evaluó de manera semicuantitativa (en relación con un control sin hidrolizado).

Los resultados están representados en forma de diagramas de barras para el colágeno tipo I en la Figura 1A, para el biglucano en la Figura 1B y para el versicano en la Figura 1C, mostrando los diagramas en cada caso el promedio de al menos 18 mediciones. Sobre la abscisa se ha llevado la expresión de ARN en relación con el control (=1). La columna llena de la izquierda representa en cada caso el control, la columna sombreada central representa el  
40 hidrolizado de alto peso molecular (como comparación) y la columna punteada derecha representa el hidrolizado de bajo peso molecular (según la invención).

Se comprueba que la síntesis de las tres proteínas de matriz se estimula mediante ambos hidrolizados de colágeno, siendo el efecto positivo del hidrolizado de bajo peso molecular siempre más marcado que el del hidrolizado de alto peso molecular. En el caso del colágeno, que, además de la elastina, es el principal responsable de la tonicidad y la elasticidad de la piel, así como en el caso del versicano, que desempeña un importante papel en el balance hídrico de la piel, el efecto reforzado del hidrolizado de bajo peso molecular es especialmente claro.

### 3. Aumento del contenido en humedad de la piel

La influencia en la humedad de la piel mediante el hidrolizado de colágeno se investigó directamente en ratones sin pelo. Los ratones sin pelo constituyen un sistema-modelo establecido que se emplea frecuentemente en cuestiones dermatológicas, y los conocimientos obtenidos del mismo pueden trasladarse en principio a la piel humana (véase por ejemplo T. Fujimura et al.; *J. Dermatol. Sci.* 2000 (24) 105-111 y Y. Nishimori et al.; *J. Invest. Dermatol.* 2001 (117) 1458-1463).

Durante un espacio de tiempo de tres semanas se dieron de comer a los animales diariamente 150 µg de hidrolizado de colágeno por kg de peso corporal, y el grupo de control recibió en su lugar ASB. Simultáneamente, todos los animales recibieron una dosis de radiación UV-B semanal de 18 mJ/cm<sup>2</sup> de superficie de la piel, con lo que se influía negativamente en la humedad de la piel.

El contenido en humedad de la piel se midió después de una semana y después de tres semanas con un Corneometer CM 825 (fabricante: Courage & Khazaka). El principio de medición se basa aquí en la modificación de la capacidad de un capacitor de precisión por la constante dieléctrica del agua fijada en las capas superiores de la piel, que se diferencia claramente de las constantes dieléctricas de la mayoría de las demás sustancias.

Los resultados están representados en forma de diagramas de barras para la medición después de una semana en la Figura 2A y para la medición después de tres semanas en la figura 2B, mostrando los diagramas en cada caso el promedio y el error estándar de 7 mediciones. Sobre la abscisa se ha llevado la humedad de la piel en relación con el control (=1). La columna llena izquierda representa en cada caso el control, la columna sombreada central representa el hidrolizado de alto peso molecular (como comparación) y la columna punteada derecha representa el hidrolizado de bajo peso molecular (según la invención).

Se comprueba que el aumento de la humedad de la piel logrado mediante el hidrolizado de bajo peso molecular, tanto después de una semana como después de tres semanas, es siempre mayor que el logrado mediante el hidrolizado de alto peso molecular. Ésta es otra prueba de la particular eficacia del hidrolizado utilizado según la invención en la mejora de la salud de la piel.

### 4. Estimulación de la síntesis de proteínas CE

Las, así llamadas, proteínas "Cornified Envelope" desempeñan un importante papel para la función barrera de la piel contra la penetración de gérmenes patógenos y sustancias tóxicas. La síntesis de las proteínas CE involucrina, loricrina y filagrina se determinó en ratones sin pelo, a los que previamente se les habían dado de comer durante cinco semanas diariamente 150 µg de hidrolizado de colágeno por kg de peso corporal (como se ha descrito anteriormente). La cuantificación de las proteínas en relación con un grupo de control (alimentado con ASB) se realizó mediante una electroforesis en gel de poli(acrilamida) con SDS y transferencia *Western* con anticuerpos específicos después de extraer las proteínas de la piel.

Los resultados están representados en forma de diagrama de barras en la Figura 3, mostrando el diagrama en cada caso el promedio y el error estándar de 7 mediciones. Sobre la abscisa se ha llevado la cantidad de las proteínas CE tras la alimentación con el hidrolizado de bajo peso molecular en relación con el control (=1). La columna izquierda representa la involucrina, la columna central representa la loricrina y la columna derecha representa la filagrina.

Se comprueba que la síntesis de las tres proteínas CE investigadas se estimula mediante la toma oral del hidrolizado de colágeno utilizado según la invención, en el caso de la involucrina incluso en más del triple.

### 5. Efecto antioxidante del hidrolizado de colágeno

El efecto antioxidante del hidrolizado de colágeno de bajo peso molecular se determinó en un sistema acelular mediante un ensayo con dialdehído malónico.

En este ensayo se comprobó que la formación de especies reactivas de oxígeno se reduce mediante el hidrolizado de colágeno en aproximadamente un 7% por término medio. De este modo es posible reducir la frecuencia de daños en el ADN en la zona de la piel, de manera que la utilización según la invención permite contrarrestar fenómenos de envejecimiento.

### 6. Análisis de la distribución de pesos moleculares mediante EM MALDI

El hidrolizado de colágeno de bajo peso molecular según la invención preparado según el ejemplo 1, que presenta un peso molecular medio de aproximadamente 2.000 Da (en lo que sigue hidrolizado A), se comparó con dos

hidrolizados de colágeno comercialmente disponibles con un peso molecular medio de aproximadamente 2.100 Da (en lo que sigue hidrolizado B) y aproximadamente 2.900 Da (en lo que sigue hidrolizado C).

5 Las distribuciones de pesos moleculares exactas de estos tres hidrolizados se analizaron mediante espectroscopia de masas MALDI (EM MALDI). Para ello, las muestras se ajustaron en ácido trifluoroacético al 0,1% a una concentración final de 10 µg/µl y a continuación se depuraron utilizando material µC<sub>18</sub>. Las muestras se prepararon con una matriz HCCA en una diana MALDI y los espectros de masa se determinaron utilizando un espectrómetro de masas Ultraflex-III-TOF/TOF (fabricante: Bruker Daltonics).

10 Las Figuras 4A a 4C muestran los espectros de masas o las distribuciones de pesos moleculares correspondientes de los hidrolizados de colágeno A, B o C, habiéndose llevado sobre la ordenada el peso molecular o el número másico y sobre la abscisa la intensidad. Una comparación de los tres espectros muestra que el hidrolizado A según la invención comprende los siguientes péptidos característicos según la Tabla 2, presentando los picos correspondientes una intensidad desde doble hasta cuádruple en comparación con su entorno:

Tabla 2

aprox. 656 Da
aprox. 825 Da
aprox. 1.014 Da
aprox. 1.211 Da
aprox. 1.927 Da
aprox. 2.410 Da
aprox. 3.433 Da

15 En particular los cuatro péptidos entre 600 y 1.500 Da no tienen equivalentes en los dos hidrolizados comerciales B y C y, por lo tanto, son especialmente característicos del hidrolizado A.

7. Estimulación de la síntesis de proteínas de matriz extracelular

20 La estimulación de la síntesis de colágeno (tipo I) y de los proteoglicanos decorina y versicano se investigó *in vitro* en fibroblastos dérmicos humanos (células de la piel). Para ello, las células se incubaron durante 24 horas con, en cada caso, 0,5 mg/ml de los hidrolizados A, B o C y, a continuación, la expresión de ARN de colágeno, ARN de decorina y ARN de versicano se determinó mediante PCR en tiempo real y se evaluó de manera semicuantitativa. La decorina desempeña un importante papel en la formación de las fibras de colágeno en la piel.

25 Los resultados están representados en forma de diagramas de barras para el hidrolizado B en la Figura 5A y para el hidrolizado C en la Figura 5B, habiéndose llevado sobre la abscisa en cada caso la expresión de ARN en los hidrolizados B o C comerciales en relación con la expresión de ARN en el hidrolizado A según la invención (=1). La columna izquierda representa en cada caso colágeno de tipo I, la columna central representa decorina y la columna derecha representa versicano. En cada caso está representado el promedio de al menos 7 mediciones y el error estándar.

30 De un modo interesante, los datos muestran que en las tres proteínas de matriz se realiza, en comparación con el hidrolizado A, una estimulación de la síntesis de ARN claramente menor mediante los dos hidrolizados B y C, cuyo peso molecular medio es sólo ligeramente mayor. Así pues, parece que los péptidos característicos del hidrolizado A desempeñan un papel decisivo para su efecto ventajoso.

8 Recetas ejemplares de productos (complementarios) alimenticios y cosméticos

35 A continuación se indican a modo de ejemplo algunas recetas para la utilización del hidrolizado de colágeno según la invención, que por supuesto pueden modificarse de muchas maneras:

Cápsulas (complemento alimenticio)

glicerina	53,67% en peso
<b>hidrolizado de colágeno</b>	21,95% en peso
gelatina	10,08% en peso
40 harina de semillas de guar	6,00% en peso

## ES 2 641 922 T3

	lecitina	5,00% en peso
	ácido cítrico	2,00% en peso
	aroma (casis)	0,50% en peso
	esencia de naranja	0,50% en peso
5	acesulfamo K	0,30% en peso
	<u>Chocolate</u>	
	pasta de cacao	51,0% en peso
	sacarosa	22,4% en peso
	manteca de cacao	16,6% en peso
10	<b>hidrolizado de colágeno</b>	10,0% en peso
	<u>Bebida</u>	
	agua	63,00% en peso
	concentrado de aloe vera	31,00% en peso
	<b>hidrolizado de colágeno</b>	4,00% en peso
15	sacarosa	1,50% en peso
	ácido cítrico	0,26% en peso
	aromas y colorantes	0,24% en peso
	sucralosa	0,0031% en peso
	<u>Champú</u>	
20	agua	58,8% en peso
	laureth-11-carboxilato de sodio	18,0% en peso
	cocoamidopropilbetaína	9,0% en peso
	<b>hidrolizado de colágeno</b>	6,0% en peso
	glicéridos caprílicos/caproílicos PEG-6	3,0% en peso
25	diestearato PEG-150	2,5% en peso
	laureth-7	2,0% en peso
	sorbato potásico	0,5% en peso
	perfume	0,2% en peso



## REIVINDICACIONES

1. Utilización no terapéutica de hidrolizado de colágeno para estimular la biosíntesis de proteínas de matriz extracelular por células de la piel, con el fin de aumentar la tonicidad de la piel, de reducir la formación de arrugas y/o de aumentar el contenido en humedad de la piel,

5 **caracterizada**

**por que** el hidrolizado de colágeno está preparado mediante la acción sucesiva de dos endoproteasas con una especificidad diferente, a una temperatura de 50 a 60 °C, durante 120 a 180 min, utilizándose como primera enzima una endoproteasa de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus amyloliquefaciens* y como segunda enzima una endoproteasa de *Bacillus licheniformis*, **por que** al menos un 45% en peso del hidrolizado de colágeno presenta un peso molecular de menos de 1.500 Da,

y

**por que** el hidrolizado de colágeno comprende al menos cuatro péptidos característicos con un peso molecular entre 600 y 1.200 Da que, en una distribución de pesos moleculares determinada mediante espectroscopia de masas MALDI, presentan una intensidad al menos doble en comparación con su entorno, habiéndose determinado el espectro de masas utilizando un espectrómetro de masas TOF/TOF con una muestra del hidrolizado de colágeno que, ajustada en ácido trifluoroacético al 0,1% a una concentración final de 10 µg/µl, se ha depurado utilizando material µC<sub>18</sub> y se ha preparado con una matriz HCCA en una diana MALDI.

2. Utilización según la reivindicación 1, en donde los al menos cuatro péptidos característicos, en la distribución de pesos moleculares determinada mediante espectroscopia de masas MALDI, presentan una intensidad al menos cuádruple en comparación con su entorno.

3. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, en donde el hidrolizado de colágeno comprende un péptido entre 620 y 690 Da, un péptido entre 790 y 860 Da, un péptido entre 980 y 1.050 Da y un péptido entre 1.175 y 1.245 Da.

4. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, en donde el hidrolizado de colágeno comprende otros péptidos característicos con un peso molecular entre 1.500 y 3.500 Da.

5. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, en donde el hidrolizado de colágeno presenta una proporción de hidroxiprolina de un 12% en peso o más.

6. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos un 50% de los aminoácidos N-terminales del hidrolizado de colágeno son aminoácidos hidrófobos, en particular alanina, leucina e isoleucina.

7. Utilización según una de las reivindicaciones precedentes, en donde el hidrolizado de colágeno está previsto para una toma oral y en particular es un complemento alimenticio o está contenido en un alimento o estimulante.

8. Utilización según la reivindicación 7, en donde está prevista una toma diaria de aproximadamente 1,5 a 5 g, preferiblemente de aproximadamente 2 a 3 g, más preferiblemente de aproximadamente 2,3 a 2,7 g, del hidrolizado de colágeno.

9. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el hidrolizado de colágeno está previsto para una aplicación tópica.

10. Utilización según la reivindicación 9, en donde el hidrolizado de colágeno está contenido en una crema, una pomada, una loción, un gel o un champú.

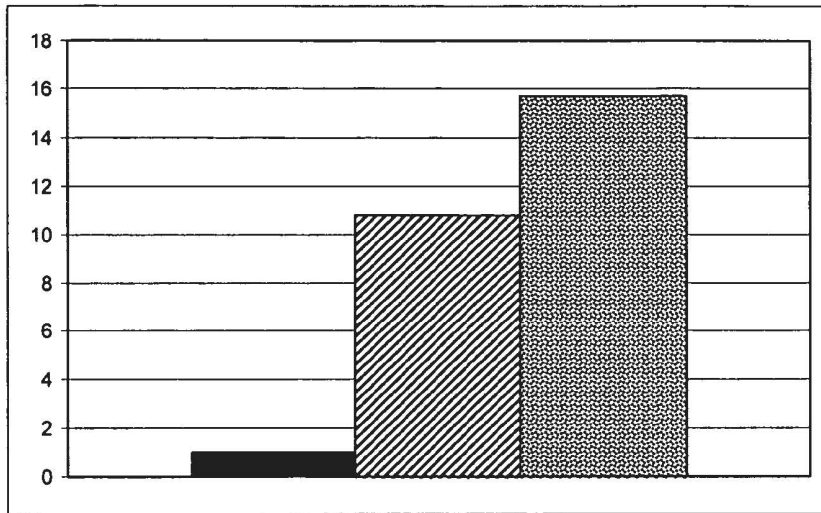
11. Hidrolizado de colágeno para la utilización en un procedimiento para mejorar la función barrera de la piel,

**caracterizado**

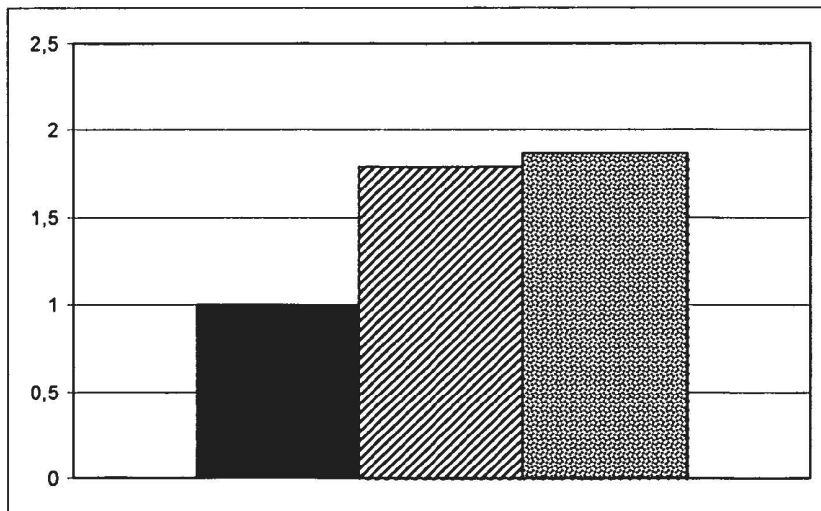
**por que** el hidrolizado de colágeno está preparado mediante la acción sucesiva de dos endoproteasas con una especificidad diferente, a una temperatura de 50 a 60 °C, durante 120 a 180 min, utilizándose como primera enzima una endoproteasa de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus amyloliquefaciens* y como segunda enzima una endoproteasa de *Bacillus licheniformis*, **por que** al menos un 45% en peso del hidrolizado de colágeno presenta un peso molecular de menos de 1.500 Da y **por que** el hidrolizado de colágeno comprende al menos cuatro péptidos característicos con un peso molecular entre 600 y 1.200 Da que, en una distribución de pesos moleculares determinada mediante espectroscopia de masas MALDI, presentan una intensidad al menos doble en comparación con su entorno, habiéndose determinado el espectro de

masas utilizando un espectrómetro de masas TOF/TOF con una muestra del hidrolizado de colágeno que, ajustada en ácido trifluoroacético al 0,1% a una concentración final de 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , se ha depurado utilizando material  $\mu\text{C}_{18}$  y se ha preparado con una matriz HCCA en una diana MALDI.

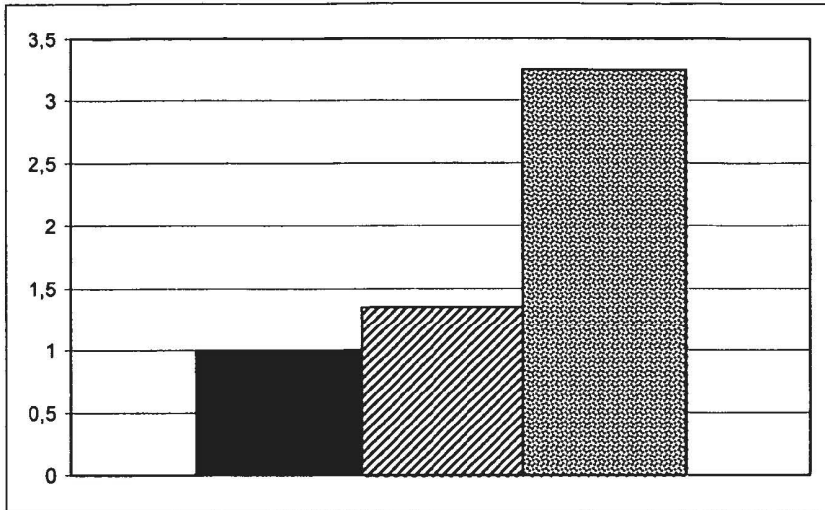
**Fig. 1A**



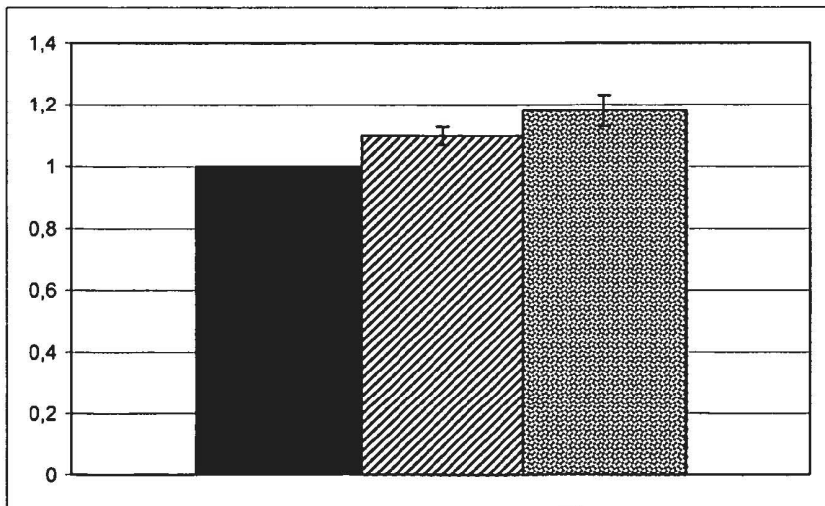
**Fig. 1B**



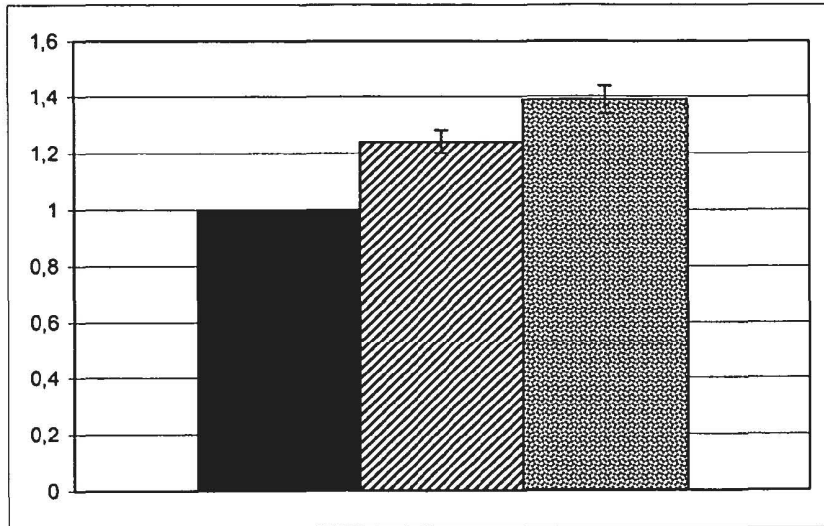
**Fig. 1C**



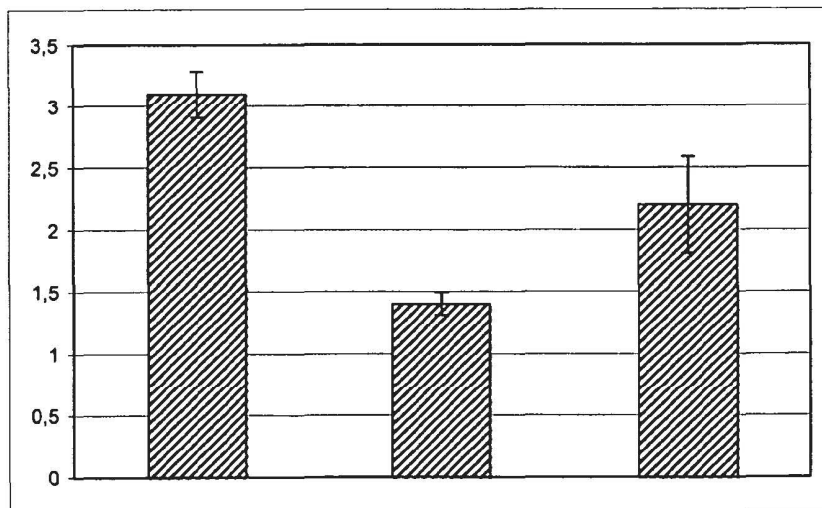
**Fig. 2A**



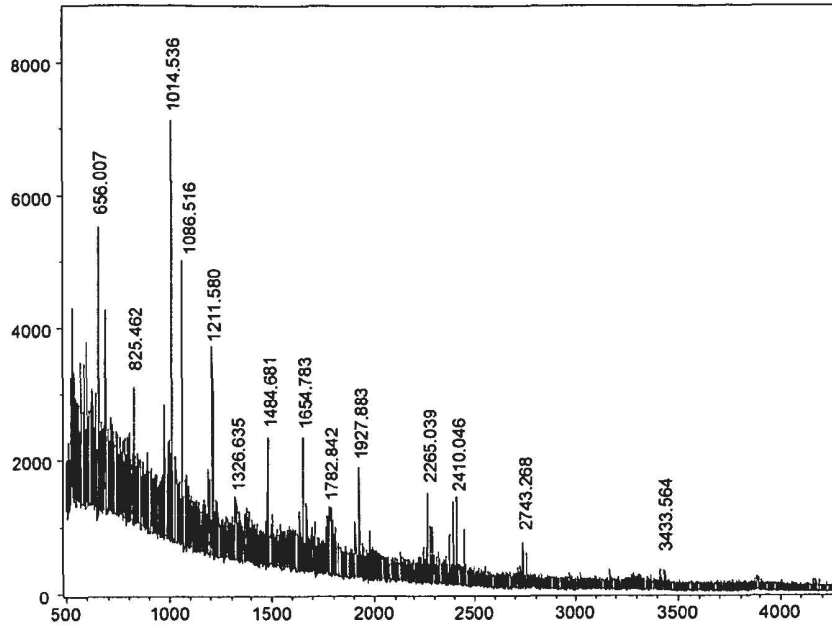
**Fig. 2B**



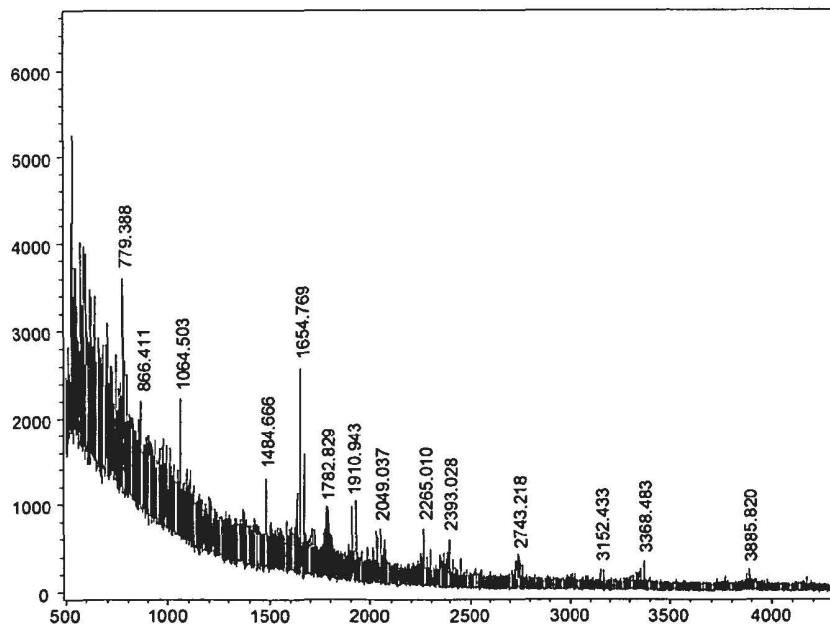
**Fig. 3**



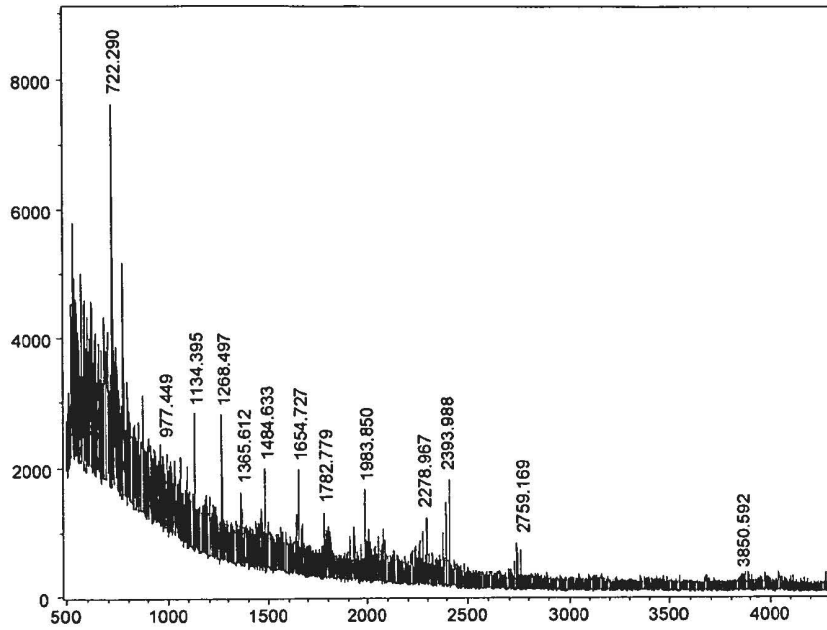
**Fig. 4A**



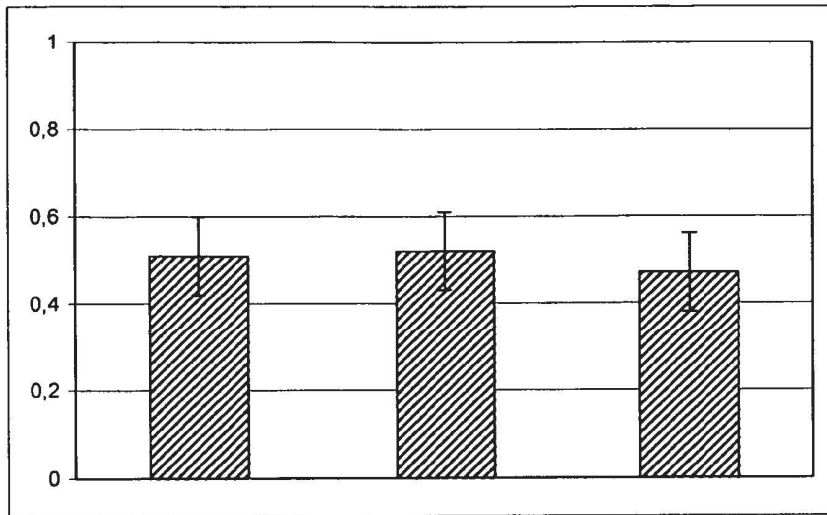
**Fig. 4B**



**Fig. 4C**



**Fig. 5A**



**Fig. 5B**

