

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 318**

51 Int. Cl.:

A61Q 19/06 (2006.01)

A61K 8/65 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2012 PCT/EP2012/073180**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13079373**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2012 E 12794246 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2785420**

54 Título: **Uso cosmético de hidrolizado de colágeno**

30 Prioridad:

29.11.2011 DE 102011055800
07.03.2012 DE 102012101911

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

FRECH, HANS-ULRICH;
OESSER, STEFFEN y
HAUSMANN, STEPHAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 669 318 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

Uso cosmético de hidrolizado de colágeno

La presente invención se refiere a un hidrolizado de colágeno y a su uso para el tratamiento y/o la prevención de celulitis.

5 En el caso de la celulitis se trata de una modificación indeseada de las propiedades de la piel que se hace perceptible externamente por la formación de nódulos en la superficie de la piel. Afectadas por ello están casi exclusivamente las mujeres, de éstas, sin embargo, con una edad creciente en hasta un 80 a 98%. La celulitis aparece ante todo en zonas con tejido graso subcutáneo acusado, es decir, en las caderas, las posaderas, la tripa, los muslos y los brazos.

10 Como causa de la celulitis se consideran según el estado de la investigación determinadas modificaciones en la dermis y el tejido conjuntivo subcutáneo, en particular un acortamiento de los septos formados por fibras de colágeno que unen la dermis reticular con los músculos situados por debajo del tejido graso subcutáneo. Esto conduce en conjunto a una disminución de la elasticidad de la piel.

15 Terapias conocidas contra la celulitis abarcan, en particular, métodos físicos tales como drenaje linfático, ultrasonidos o vacío, pero estos no proporcionan, por norma general, éxito alguno o al menos ningún éxito duradero. También la aplicación tópica de productos cosméticos tales como cremas o pomadas no posibilita un tratamiento causal de la celulitis, dado que las capas de la piel superiores de la epidermis no participan directamente en el fenómeno.

20 Es ya conocido que mediante la ingesta oral de hidrolizado de colágeno se pueden conseguir efectos ventajosos en relación con la salud de la piel en el ser humano (véase V. Zague: "A new view concerning the effects of collagen hydrolysate intake on skin properties" en *Arch. Dermatol. Res.* 2008 (9) 479). En virtud de la capacidad de resorción de correspondientes péptidos de colágeno de bajo peso molecular y del buen riego sanguíneo de la piel tiene lugar allí en particular medida una acumulación de hidrolizado de colágeno ingerido por vía oral, siendo la concentración más elevada en el espacio de tiempo de aproximadamente 12 a 24 horas después de la ingesta (véase M. Watanabe-Kamiyama et al.: "Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats" en *J. Agric. Food Chem.* 2010 (58) 835).

25 En el folleto "Peptan - Das ideale Protein für einen gesunden Lebensstil", publicado por la empresa Rousselot en febrero de 2009, el hidrolizado de colágeno se postula como un complemento alimenticio, entre otros para mejorar la resistencia y elasticidad de la piel.

30 En un artículo de J. Liang et al. en *Journal of Food Science* 2010 (75) H230-H238 se muestra en un ensayo con animales con ratas que hidrolizado de colágeno marino de la piel del salmón presenta una influencia sobre la homeostasis de la matriz de colágeno en la piel envejecida.

35 En un artículo de V. Zague et al. en *Journal of Medicinal Food* 2011 (14) 618-624, se muestra asimismo en un ensayo con animales con ratas que la ingesta de hidrolizado de colágeno conduce a un aumento de la expresión de colágeno en la piel y suprime la actividad de la metaloproteínasa 2.

En un artículo de D. Hexsel et al. en *Seminars on Cutaneous Medicine and Surgery* 2011 (30) 167-170 se describen diferentes sustancias activas que se propusieron como "cosmocéuticos" para el tratamiento de la celulitis, existiendo apenas testimonios clínicos en cuanto a su eficacia.

40 Ante estos antecedentes, la presente invención propone un nuevo enfoque para el tratamiento causal y/o la prevención de celulitis, consistiendo este enfoque en el uso de hidrolizado de colágeno.

La invención es la que está contenida en las reivindicaciones.

45 Un aspecto de la invención se refiere, por consiguiente, al uso cosmético de hidrolizado de colágeno para el tratamiento y/o la prevención de celulitis, presentando el hidrolizado de colágeno un peso molecular medio de 1.700 a 2.300 Da, en donde al menos el 45% en peso del hidrolizado de colágeno presenta un peso molecular menor que 1.500 Da y en donde el hidrolizado de colágeno está previsto para una administración oral.

Realmente, en un estudio clínico pudo demostrarse que como consecuencia de la administración de hidrolizado de colágeno aumenta de manera mensurable la elasticidad de la piel. Este efecto es particularmente acusado en el caso de mujeres con una edad superior a 50 años. Una elevada elasticidad de la piel significa una menor manifestación de celulitis.

50 Además, diferentes ensayos *in vitro* confirman que la síntesis de proteínas de la matriz extracelular del tejido conjuntivo dérmico es estimulada por hidrolizado de colágeno. Estas proteínas formadas por las células de la piel (fibroblastos dermales) comprenden colágeno (en particular del tipo I), elastina y proteoglicanos (tales como biglicano, versicano y decorina). La síntesis de estas proteínas en cantidad suficiente es decisiva para la constitución

o bien la regeneración de la matriz extracelular de la piel, la cual, de nuevo, es esencialmente determinante para las propiedades de la dermis tales como elasticidad, fuerza elástica y equilibrio hídrico.

El hidrolizado de colágeno utilizado en el marco de la invención presenta un peso molecular relativamente bajo. En este caso, al menos el 45% en peso del hidrolizado de colágeno presenta un peso molecular menor que 1.500 Da. Se ha demostrado que mediante porciones de peso molecular particularmente bajo de este tipo se pueden conseguir claros efectos. La distribución del peso molecular del hidrolizado de colágeno, que se basa en los valores límite correspondientes, puede determinarse, p. ej., mediante una cromatografía de permeación en gel utilizando un patrón de calibración a base de fragmentos de colágeno definidos de forma muy precisa y reproducible.

El peso molecular medio (media ponderal M_w) del hidrolizado de colágeno utilizado se encuentra en el intervalo de aprox. 1.700 hasta aprox. 2300 Da.

En el caso de una forma de realización preferida de la solicitud, el hidrolizado de colágeno comprende al menos cuatro péptidos característicos con un peso molecular entre 600 y 1.200 Da. Los hidrolizados de colágeno contienen péptidos con diferentes longitudes de cadena o bien pesos moleculares que se forman durante la disociación de las cadenas de proteínas del colágeno, pudiendo diferenciarse las distribuciones de los pesos moleculares de estos péptidos en función de las condiciones de preparación del hidrolizado. Sorprendentemente, se ha demostrado que un hidrolizado de colágeno con las propiedades precedentemente mencionadas repercute de manera particularmente ventajosa sobre la síntesis de proteínas de la matriz, es decir, muestra resultados claramente mejores que los hidrolizado de colágeno que no contienen los péptidos característicos.

La presencia de los péptidos característicos del hidrolizado de colágeno puede determinarse, en particular, mediante espectroscopía de masas MALDI, manifestándose los péptidos característicos en el espectro de masas como picos. Preferiblemente, los al menos cuatro péptidos característicos presentan en una distribución de los pesos moleculares, determinada mediante espectroscopía de masas MALDI, una intensidad al menos doble, más preferiblemente una intensidad al menos cuádruple en comparación con su entorno.

En el caso de 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. El hidrolizado de colágeno puede presentar adicionalmente también péptidos característicos entre 1.500 y 3.500 Da.

Preferiblemente, el hidrolizado de colágeno presenta una porción de hidroxiprolina de 12% en peso o más. El aminoácido hidroxiprolina, formado por la hidroxilación post-traducción de prolina, se presenta exclusivamente en el colágeno, de modo que una elevada proporción de hidroxiprolina en el hidrolizado de colágeno representa una medida de la amplia ausencia de otras proteínas del tejido conjuntivo (p. ej., elastina y proteoglicanos), cuyos fragmentos pueden estar asimismo contenidos en determinadas cantidades en hidrolizados de colágeno en función del procedimiento de preparación.

Es favorable que el hidrolizado de colágeno se prepare mediante hidrólisis enzimática de gelatina. La gelatina comprende colágeno desnaturalizado y se obtiene mediante diferentes procedimientos, conocidos por el experto en la materia, 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, en particular de cerdos o ganado vacuno, pero no estando tampoco excluido el uso de gelatina de aves de corral. La gelatina porcina es particularmente preferida como material de partida, en particular gelatina de la corteza de tocino de cerdo.

La hidrólisis enzimática de la gelatina tiene lugar, por norma general, mediante al menos una endoproteasa, siendo preferido en el marco de la invención emplear varias endoproteasas (es decir, al menos dos endoproteasas distintas), con el fin de influir con ello de manera correspondiente en el perfil de aminoácidos del hidrolizado de colágeno resultante y aumentar el efecto positivo del hidrolizado.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la invención, el hidrolizado de colágeno se prepara mediante la acción consecutiva sucesiva de al menos dos endoproteasas con una especificidad diferente, en particular de al menos dos metaloproteasas y/o serinproteasas diferentes, es decir, de proteasas que disocian la secuencia de aminoácidos de las moléculas de colágeno en cada caso delante o bien detrás de determinados aminoácidos. De manera favorable, en el caso de las metaloproteasas y/o serinproteasas se trata de enzimas de los microorganismos *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus melleus*.

Mediante la elección de endoproteasas adecuadas se puede obtener no sólo la distribución del peso molecular característica del hidrolizado de colágeno, sino también el tipo de aminoácidos en los extremos de los péptidos contenidos en el hidrolizado. A este respecto, p. ej., se prefiere particularmente que al menos el 50% de los aminoácidos N-terminales del hidrolizado de colágeno sean aminoácidos hidrofóbicos, en particular alanina, leucina e isoleucina.

Conforme a la invención, el hidrolizado de colágeno está previsto para una aplicación enteral, a saber en forma de una ingesta oral. En el caso de la ingesta oral resulta un transporte más eficaz del hidrolizado de colágeno a lo largo

del torrente sanguíneo hacia el lugar de acción, es decir, en particular hacia los fibroblastos dermales, que en el caso de una aplicación tópica. Además, esta forma de administración está ligada, por norma general, con una complejidad esencialmente menor para el usuario.

5 Dado que el hidrolizado de colágeno se obtiene a partir de materias primas admitidas por la Legislación Alimentaria, éste puede emplearse en el marco de la presente invención para el tratamiento y/o la prevención de celulitis, preferiblemente como complemento alimentario. Complementos alimentarios de este tipo pueden designarse como “nutracéuticos” o “nutricosméticos”.

10 Los complementos alimentarios pueden ofrecerse en casi cualquier forma arbitraria, p. ej., en forma de comprimidos, cápsulas, grageas, pastillas, saquitos o también de un gel o una solución (p. ej., en ampollas individuales o en bebidas).

El hidrolizado de colágeno puede estar contenido alternativamente también en un alimento o estimulante, p. ej., en dulces, o en un polvo instantáneo para la preparación de bebidas. El hidrolizado puede ser tomado de este modo por el usuario sin una complejidad adicional en el marco de una alimentación normal (la denominada “Functional Food”). A este respecto, es particularmente ventajoso que el hidrolizado de colágeno sea esencialmente neutro en sabor.

15 Es favorable que se prevea una ingesta diaria de aprox. 1,5 a 5 g, preferiblemente de aprox. 2 a 3 g, más preferiblemente de aprox. 2,3 a 2,7 g del hidrolizado de colágeno. Se ha demostrado que mediante la ingesta oral de esta cantidad de hidrolizado ya se puede alcanzar un claro efecto que se puede aumentar sin más esencialmente mediante un aumento de la dosis diaria.

20 El hidrolizado de colágeno puede combinarse en el marco del uso de acuerdo con la invención con otras sustancias activas que tienen un efecto ventajoso sobre la salud y, en particular, sobre la salud de la piel, entre otras con sustancias activas con un efecto antioxidante. Sustancias activas de este tipo se eligen preferiblemente de vitaminas, en particular vitamina C y E, minerales, ácidos grasos omega-3, ácidos grasos omega-6, ácidos grasos omega-9, biotina, luteína, licopina, cafeína, glucosamina, condroitina, ácido hialurónico, ácido fólico, aminoácidos, ubiquinona-10, superóxido-dismutasa, así como extractos vegetales de escaramujo, cedrón o té verde.

25 En el caso de una forma de realización preferida de la invención, la administración del hidrolizado de colágeno está prevista para el tratamiento y/o la prevención de celulitis, en particular en mujeres de edad superior a 50 años que se encuentran la mayoría en la post-menopausia. En el caso de este grupo de edad, que por lo general está muy fuertemente afectado por la celulitis, los efectos son particularmente claros tal como se demostró por el estudio clínico descrito más adelante.

30 Además, la invención se refiere también al uso de hidrolizado de colágeno para el tratamiento cosmético y/o la prevención de celulitis o de estrías que se manifiestan, en particular, en forma de las denominadas estrías del embarazo (*Striae gravidarum*) en el caso de mujeres embarazadas, presentando el hidrolizado de colágeno un peso molecular medio de 1.700 a 2.300 Da y donde al menos el 45% en peso del hidrolizado de colágeno presenta un peso molecular menor que 1.500 Da. El origen de estas estrías son grietas finas en el tejido conjuntivo subcutáneo en virtud de la considerable dilatación de la piel. De manera similar al caso de la celulitis, también se puede 35 contrarrestar la aparición de grietas de este tipo mediante un aumento de la elasticidad de la piel por administración de hidrolizado de colágeno.

40 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de hidrolizado de colágeno para el tratamiento y/o la prevención de lesiones locales de la piel como consecuencias de úlceras (decúbito) tal como, p. ej., la formación de úlceras decúbito. En este caso, la piel es expuesta a una sollicitación de presión desde el exterior, cuyas consecuencias negativas se pueden reducir asimismo mediante un aumento de la elasticidad de la piel.

Estas y otras ventajas de la invención se describen con mayor detalle con ayuda de los siguientes ejemplos, haciendo referencia a las figuras. Muestran, en particular:

- 45 Las Figuras 1A a 1C: diagramas referentes a la estimulación de la síntesis de colágeno de tipo-I, biglicano o bien versicano;
- las Figuras 2A y 2B: diagramas referentes al aumento de la humedad de la piel en el caso de ratones sin pelo;
- la Figura 3: un diagrama referente a la estimulación de la síntesis de proteínas de CE;
- las Figuras 4A a 4C: espectros de masas MALDI de diferentes hidrolizados de colágeno; y
- 50 las Figuras 5A y 5B: diagramas correspondientes a la estimulación de la síntesis de colágeno de tipo-I, decorina y versicano.

Ejemplos

1. Preparación y propiedades del hidrolizado de colágeno

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

La distribución del peso molecular del hidrolizado de colágeno resultante puede determinarse mediante cromatografía de permeación en gel utilizando los siguientes parámetros:

10 Fase estacionaria: TSK 2000 SW XL (Tosoh Bioscience GmbH)
 Fase móvil: 0,4 mol/l de dihidrógeno-fosfato sódico pH 5,3
 Caudal: 0,5 ml/min
 Patrón de calibrado: fragmentos de colágeno tipo-I definidos (FILK, Freiberg)
 Detección: detector UV Knauer K-2501 a 214 nm

15 La determinación proporcionó una distribución del peso molecular para este hidrolizado de colágeno (designado en lo que sigue como hidrolizado de bajo peso molecular) de acuerdo con la siguiente Tabla 1. Para fines comparativos, en la Tabla 1 se indica también la distribución del peso molecular de un hidrolizado de colágeno adquirible en el comercio que fue determinado con el mismo método (designado en lo que sigue como hidrolizado de elevado peso molecular):

20 Tabla 1

Intervalo de 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 asciende a aprox. 12 hasta 13% en peso y puede determinarse fotométricamente después de la oxidación con cloramina-T y reacción con p-dimetilamino-benzaldehído. Más del 50% de los aminoácidos N-terminales del hidrolizado son aminoácidos hidrofóbicos, en particular alanina, leucina e isoleucina.

2. Estudio clínico para la eficacia del hidrolizado de colágeno en el caso de celulitis

30 En un estudio doble ciego, al azar, controlado por placebo, se examinó la eficacia del hidrolizado de colágeno de bajo peso molecular preparado conforme al Ejemplo 1 en el caso del tratamiento y/o la prevención de celulitis. En el caso de los participantes en el estudio se trataba de 69 mujeres sanas con una edad de 35,3 a 55,4 años que fueron divididas en tres grupos, en cada caso con 23 sujetos de estudio. 68 sujetos de estudio terminaron el estudio con éxito.

35 A partir de seis semanas antes del comienzo del estudio no pudieron aplicarse productos terapéuticos dermatológicos, además, los sujetos de estudio no podían variar antes y durante el estudio sus hábitos de vida y alimentarios, ingerir complementos alimentarios o preparados vitamínicos adicionales y exponer su piel a una radiación UV intensa. En los lados volantes de los antebrazos, en donde debían examinarse los efectos del hidrolizado de colágeno sobre las propiedades de la piel, no pudieron emplearse productos cosméticos.

40 De los tres grupos, el primero recibió durante un espacio de tiempo de ocho semanas diariamente 2,5 g de hidrolizado de colágeno (en cada caso por la mañana), el segundo diariamente 5 g de hidrolizado de colágeno (en cada caso 2,5 g por la mañana y al mediodía) y el tercero un placebo. Para la ingesta oral, el hidrolizado pudo disolverse en agua o en otra bebida fría (con excepción de leche).

Antes de la primera toma, después de cuatro semanas y después de ocho semanas se midieron los siguientes parámetros de la piel en el lado volante del brazo izquierdo de los sujetos de estudio:

- Elasticidad de la piel con un Cutometer® SEM 575 (en cada caso valor medio de tres mediciones)
- Pérdida de agua transepidérmica (TEWL) con un aparato DermaLab® (en cada caso valor medio de tres mediciones)
- Humedad de la piel con un Corneometer® CM 825 (en cada caso valor medio de diez mediciones).

5 Todas las mediciones se llevaron a cabo después de una aclimatación durante 30 minutos en un recinto climatizado a una temperatura de 21,5°C (± 1°C) y una humedad relativa del aire de 50% (± 5%).

Los tres parámetros habían aumentado de manera significativa en el caso de los grupos tratados con hidrolizado de colágeno tanto después de cuatro como también después de ocho semanas. Los valores medidos después de ocho semanas están indicados en la siguiente Tabla 2, a saber, como aumento porcentual con respecto al grupo tratado con placebo:

10

Tabla 2

Parámetro	2,5 g de hidrolizado al día	5 g de hidrolizado al día
Elasticidad de la piel	aprox. 7%	aprox. 9%
TEWL	aprox. 11%	aprox. 14%
Humedad de la piel	aprox. 6%	aprox. 7%

En particular, el aumento de la elasticidad de la piel confirma la eficacia de la administración oral de hidrolizado de colágeno para el tratamiento y/o la prevención de celulitis. La mejora de la TEWL y de la humedad de la piel representa otros efectos ventajosos del hidrolizado sobre la salud de la piel y conducen, en particular, a un aumento de la función de barrera epidérmica.

15

En el caso de una observación diferenciada según grupos de edad del aumento de la elasticidad de la piel, se proporcionó el resultado representado en la Tabla 3, confrontándose mujeres por debajo de 50 años (edad media 44,1 años) con mujeres por encima de 50 años (edad media 53,0 años):

20 Tabla 3

Elasticidad de la piel	2,5 g de hidrolizado al día	5 g de hidrolizado al día
Mujeres por debajo de 50	aprox. 3%	aprox. 5%
Mujeres por encima de 50	aprox. 14%	aprox. 15%

Lo llamativo es la mejora especialmente clara de la elasticidad de la piel en el caso de mujeres en una edad superior a 50 años que, por consiguiente, representan un grupo objetivo preferido para el uso de acuerdo con la invención de hidrolizado de colágeno.

25 La elasticidad de la piel se midió de nuevo cuatro semanas después de finalizar el espacio de tiempo de administración de ocho semanas. En este caso, se mantuvieron todavía aproximadamente 92 a 98% de los aumentos medidos al cabo de ocho semanas, lo cual apunta a un efecto más duradero del hidrolizado de colágeno.

3. Estimulación de la síntesis de proteínas de la matriz extracelulares *in vitro*

30 La estimulación de la síntesis de colágeno (tipo I), así como de los proteoglicanos biglicano y versicano se examinó *in vitro* en fibroblastos dermales (células de la piel) humanos. Para ello, las células se incubaron durante 24 horas, en cada caso con 0,5 mg/ml del hidrolizado de bajo molecular o bien del hidrolizado de alto peso molecular y, a continuación, se determinó la expresión de ARN de colágeno, ARN de biglicano y ARN de versicano mediante PCR en tiempo real y se evaluó semicuantitativamente (referido a un control sin hidrolizado).

35 Los resultados están representados como diagramas de columna para colágeno de tipo I en la Figura 1A, para biglicano en la Figura 1B y para versicano en la Figura 1C, mostrando los diagramas en cada caso el valor medio de al menos 18 mediciones. En abscisas se registra la expresión de ARN con relación al control (= 1). La columna rellena de la izquierda representa en cada caso el control, la columna sombreada central representa el hidrolizado de elevado peso molecular y la columna de puntos de la derecha representa el hidrolizado de bajo peso molecular.

40 Se demuestra que la síntesis de las tres proteínas de la matriz es estimulada por ambos hidrolizados de colágeno, estando en cada caso más intensamente acusado el efecto positivo del hidrolizado de bajo peso molecular que el

del hidrolizado de elevado peso molecular. En el caso de colágeno que, junto a elastina, es el responsable principal de la fuerza de tensión y elasticidad de la piel, así como en el caso de versicano, que juega un papel importante en el equilibrio de humedad de la piel, resulta de manera particularmente clara el efecto reforzado del hidrolizado de bajo peso molecular.

- 5 Estas propiedades estimulantes del hidrolizado de colágeno sobre las distintas proteínas de la matriz ofrecen, junto al tratamiento y/o la prevención de acuerdo con la invención de celulitis, también un punto de partida en el caso de enfermedades tales como, p. ej., la psoriasis, en las que está perjudicada la funcionalidad natural de la piel.

4. Aumento del contenido de humedad de la piel en el ensayo con animales

10 La influencia de la humedad de la piel por parte del hidrolizado de colágeno se examinó directamente en ratones sin pelo. Los ratones sin pelo representan un sistema modelo establecido que se emplea a menudo en el caso de planteamientos dermatológicos, y los conocimientos obtenidos de ello se pueden transferir en principio a la piel humana (véase, p. ej., T. Fujimora et al.; *J. Dermatol. Sci.* 2000 (24) 105-111 e Y. Nishimori et al.; *J. Invest. Dermatol.* 2001 (117) 1458-1463).

15 Los animales fueron alimentados durante un espacio de tiempo de tres semanas diariamente con 150 µg de hidrolizado de colágeno por kg de peso corporal, por el contrario, el grupo control recibió BSA. Al mismo tiempo, todos los animales recibieron una dosis de radiación UV-B semanal de 18 mJ/cm² de superficie de la piel, con lo cual se influye negativamente sobre la humedad de la piel.

20 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 en este caso en la variación de la capacidad de un condensador de medición por la constante dieléctrica del agua ligada en las capas superiores de la piel, que se diferencia claramente de las constantes dieléctricas de la mayoría de las otras sustancias.

25 Los resultados están representados como diagramas de columnas 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 valor medio y el error típico de 7 mediciones. En abscisas se registra la humedad de la piel con relación al control (= 1). La columna rellena de la izquierda representa en cada caso el control, la columna sombreada central representa el hidrolizado de elevado peso molecular y la columna de puntos de la derecha representa el hidrolizado de bajo peso molecular.

30 Se demuestra que el aumento de la humedad de la piel mediante el hidrolizado de bajo peso molecular, tanto después de una semana como también después de tres semanas es en cada caso más intenso que mediante el hidrolizado de elevado peso molecular.

5. Estimulación de la síntesis de proteínas de CE *in vitro*

35 Las denominadas proteínas de la "envoltura cornificada" (CE) juegan un papel importante para la función de barrera de la piel frente a la penetración de gérmenes patógenos y sustancias tóxicas. La síntesis de las proteínas de CE involucrina, loricrina y filagrina se determinó en el caso de ratones sin pelo que previamente habían sido alimentados durante cinco semanas diariamente con 150 µg de hidrolizado de colágeno por kg de peso corporal (tal como se describe arriba). La cuantificación de las proteínas con relación a un grupo control (alimentación con BSA) tuvo lugar mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y transferencia Western con anticuerpos específicos después de la extracción de las proteínas de la piel.

40 Los resultados están representados como diagrama de columnas en la Figura 3, mostrando el diagrama en cada caso el valor medio y el error típico de 7 mediciones. En abscisas se registra la cantidad de proteínas de CE después de la alimentación con el hidrolizado de bajo peso molecular con relación al control (= 1). La columna de la izquierda representa involucrina, la columna central representa loricrina y la columna de la derecha representa filagrina.

45 Se demuestra que la síntesis de las tres proteínas de CE examinadas es estimulada mediante la ingesta oral de hidrolizado de colágeno, en el caso de involucrina incluso en más del triple.

6. Análisis de la distribución del peso molecular mediante MALDI-MS

50 El hidrolizado de colágeno de bajo peso molecular preparado conforme al Ejemplo 1, que presenta un peso molecular medio de aprox. 2.000 Da (en lo que sigue hidrolizado A), se confrontó con dos hidrolizados de colágeno adquiribles en el comercio con un peso molecular medio de aprox. 2.100 Da (en lo que sigue hidrolizado B) y aprox. 2.900 Da (en lo que sigue hidrolizado C).

Las distribuciones del peso molecular exactas de estos tres hidrolizados se analizaron mediante espectroscopía de masas MALDI (MALDI-MS). Para ello, las muestras en ácido trifluoroacético al 0,1% se ajustaron a una concentración final de 10 µg/µl y, a continuación, se purificaron utilizando material µC₁₈. Las muestras se prepararon

con una matriz de HCCA sobre una diana MALDI y los espectros de masas se determinaron utilizando un espectrómetro de masas Ultraflex-III-TOF/TOF (fabricante: Bruker Daltonics).

- 5 Las Figuras 4A a 4C muestran los espectros de masas o bien distribuciones de pesos moleculares correspondientes de los hidrolizados de colágeno A, B o bien C, estando recogido en ordenadas el peso molecular o bien el número de masa y en abscisas la intensidad. Una comparación de los tres espectros demuestra que el hidrolizado A comprende los siguientes péptidos característicos conforme a la Tabla 4, presentando los picos correspondientes una intensidad doble a cuádruple en comparación con su entorno:

Tabla 4

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

- 10 En particular, los cuatro péptidos entre 600 y 1.500 Da no tienen correspondencia con los dos hidrolizados B y C comerciales y, por consiguiente, son particularmente característicos para el hidrolizado A.

7. Estimulación de la síntesis de proteínas de la matriz extracelulares *in vitro*

- 15 La estimulación de la síntesis de colágeno (tipo I), así como de los proteoglicanos decorina y versicano se examinó *in vitro* en fibroblastos dermales (células de la piel) humanos. Para ello, las células se incubaron durante 24 horas en cada caso con 0,5 mg/ml de los hidrolizados A, B o bien C y, a continuación, se determinó la expresión de ARN de colágeno, ARN de decorina y ARN de versicano mediante PCR en tiempo real y se evaluó semicuantitativamente. Decorina juega un papel importante en la formación de las fibras de colágeno en la piel.

- 20 Los resultados están representados como diagramas de columnas para el hidrolizado B en la Figura 5A y para el hidrolizado C en la Figura 5B, estando recogida en abscisas en cada caso la expresión de ARN en el caso de los hidrolizados B o bien C comerciales con relación a la expresión de ARN en el hidrolizado A (= 1). La columna de la izquierda representa en cada caso colágeno de tipo I, la columna central representa decorina y la columna de la derecha representa versicano. Se representa en cada caso el valor medio de al menos 7 mediciones, así como el error típico.

- 25 De manera interesante, los datos demuestran que en el caso de las tres proteínas de la matriz tiene lugar una estimulación claramente menor en comparación con el hidrolizado A de la síntesis de ARN por parte de los dos hidrolizados B y C, cuyo peso molecular medio es sólo ligeramente superior. Los péptidos característicos del hidrolizado A parecen, por consiguiente, jugar un papel decisivo para su efecto ventajoso.

8. Recetas de ejemplo para alimentos (complementos alimentarios)

- 30 En lo que sigue se indican algunas recetas a modo de ejemplo para el uso de acuerdo con la invención del hidrolizado de colágeno, que naturalmente pueden ser modificadas de múltiples maneras:

Capsuletas (complemento alimentario)

Glicerol	53,67% en peso
Hidrolizado de colágeno	21,95% en peso
Gelatina	10,08% en peso
35 Harina de semilla de guar	6,00% en peso
Lecitina	5,00% en peso
Ácido cítrico	2,00% en peso
Aroma (Cassis)	0,50% en peso

ES 2 669 318 T3

	Aceite de naranja	0,50% en peso
	Acesulfamo-K	0,30% en peso
	Chocolate	
5	Masa de cacao	51,0% en peso
	Sacarosa	22,4% en peso
	Manteca de cacao	16,6% en peso
	Hidrolizado de colágeno	10,0% en peso
10	Bebida	
	Agua	63,00% en peso
	Concentrado de Aloe-Vera	31,00% en peso
	Hidrolizado de colágeno	4,00 % en peso
	Sacarosa	1,50% en peso
15	Ácido cítrico	0,26% en peso
	Aromas y colorantes	0,24% en peso
	Sucralosa	0,0031% en peso

REIVINDICACIONES

1. Uso cosmético de hidrolizado de colágeno para el tratamiento y/o la prevención de celulitis y/o de estrías, en particular de estrías del embarazo, presentando el hidrolizado de colágeno un peso molecular medio de 1.700 a 2.300 Da, en donde al menos el 45% en peso del hidrolizado de colágeno presenta un peso molecular menor que 1.500 Da, y en donde el hidrolizado de colágeno está previsto para una administración oral.
2. Uso según la reivindicación 1, 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.
3. Uso según la reivindicación 1, en donde el hidrolizado de colágeno presenta una porción de hidroxiprolina de 12% en peso o más.
4. Uso según una de las reivindicaciones precedentes, en donde el hidrolizado de colágeno se prepara mediante hidrólisis enzimática de gelatina.
5. Uso según la reivindicación 4, en donde el hidrolizado de colágeno se prepara mediante la acción consecutiva sucesiva de al menos dos endoproteasas con una especificidad diferente, en particular de al menos dos metaloproteasas y/o serinoproteasas diferentes.
6. Uso según una de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos el 50% de los aminoácidos N-terminales del hidrolizado de colágeno son aminoácidos hidrofóbicos, en particular alanina, leucina e isoleucina.
7. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el hidrolizado de colágeno es un complemento alimentario y, en particular, se presenta en forma de comprimidos, cápsulas, grageas, pastillas, saquitos o un gel o una solución.
8. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde está prevista una ingesta diaria de aprox. 1,5 a 5 g, preferiblemente de aprox. 2 a 3 g, más preferiblemente de aprox. 2,3 a 2,7 g del hidrolizado de colágeno.
9. Uso según una de las reivindicaciones precedentes, en donde el hidrolizado de colágeno está combinado con una o varias sustancias activas que se eligen de vitaminas, minerales, ácidos grasos omega-3, ácidos grasos omega-6, ácidos grasos omega-9, biotina, luteína, licopina, cafeína, glucosamina, condroitina, ácido hialurónico, ácido fólico, aminoácidos, ubiquinona-10, superóxido-dismutasa, así como extractos vegetales de escaramujo, cedrón o té verde.
10. Uso según una de las reivindicaciones precedentes, en donde el hidrolizado de colágeno está previsto para una administración a mujeres de edad superior a 50 años, en particular a mujeres en la post-menopausia.

Fig. 1A

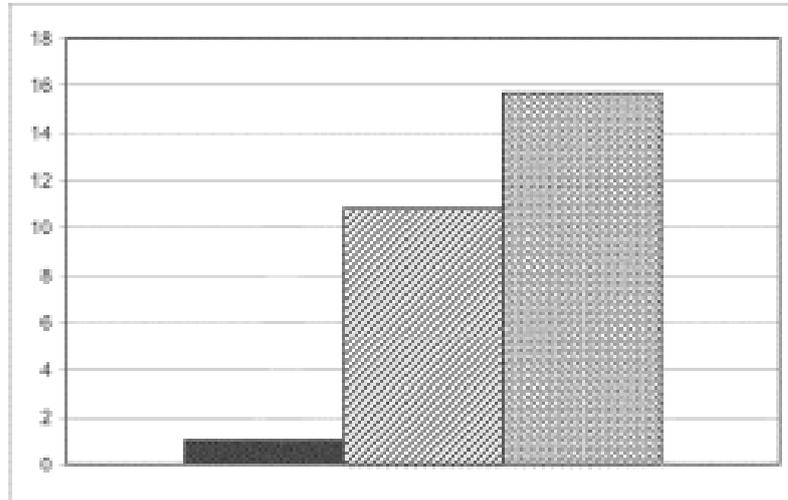


Fig. 1B

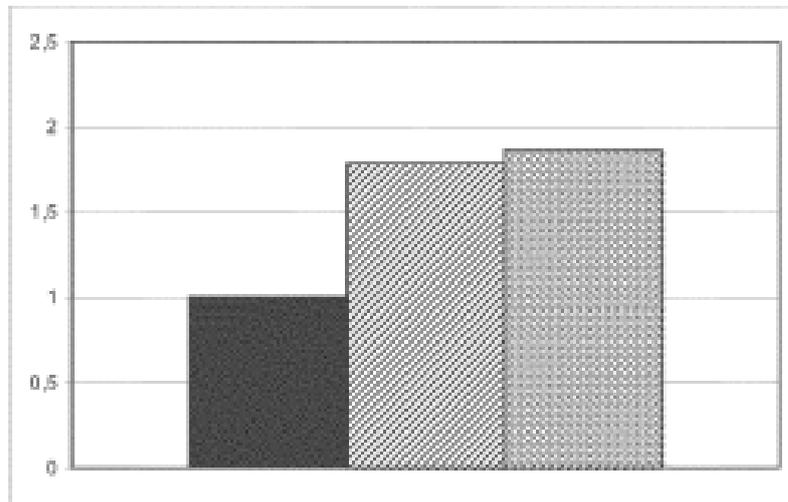


Fig. 1C

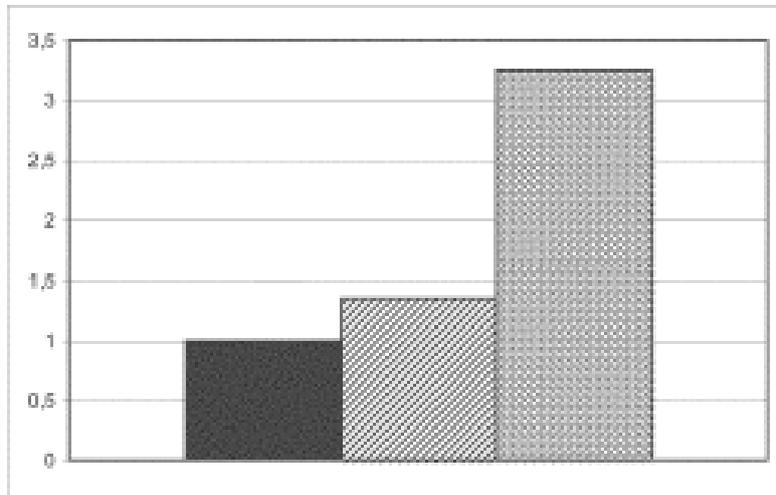


Fig. 2A

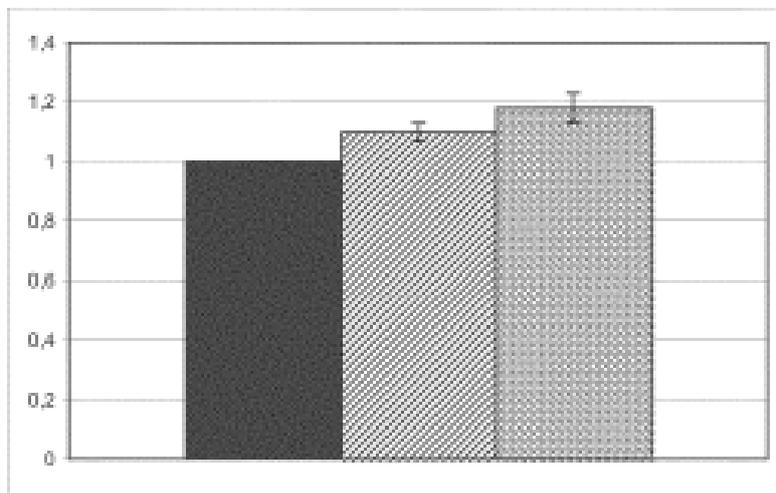


Fig. 2B

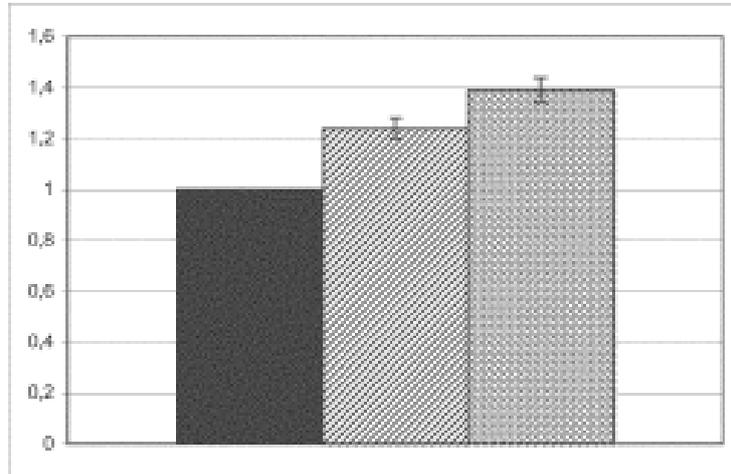


Fig. 3

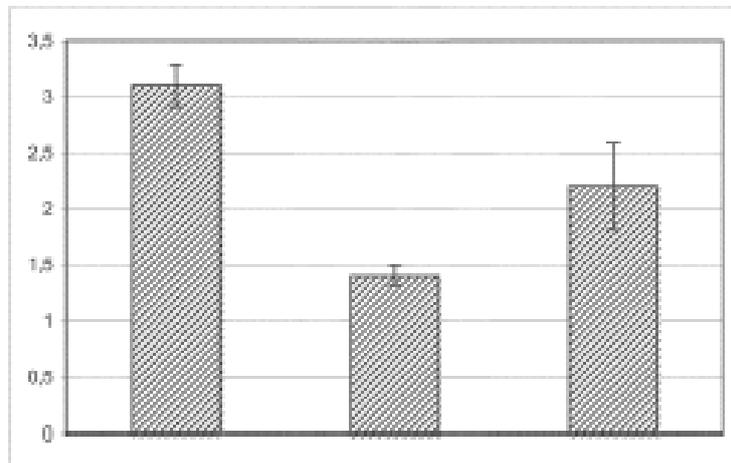


Fig. 4A

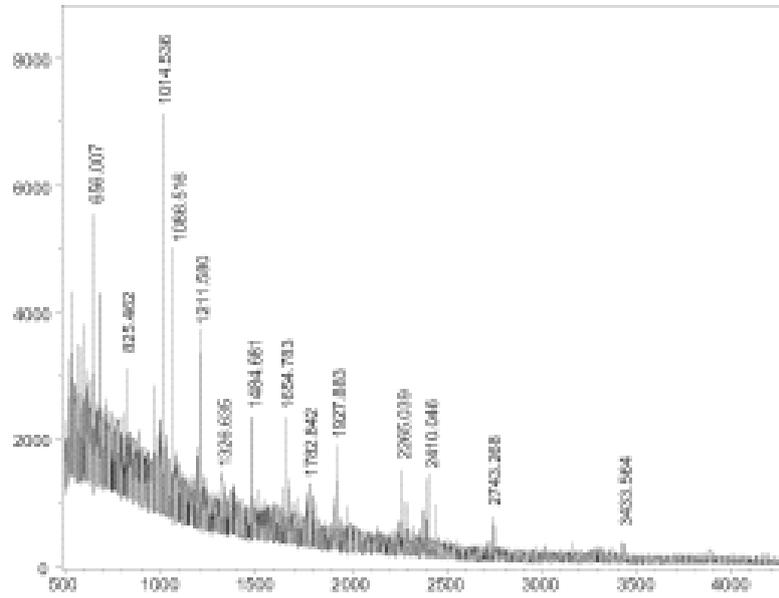


Fig. 4B

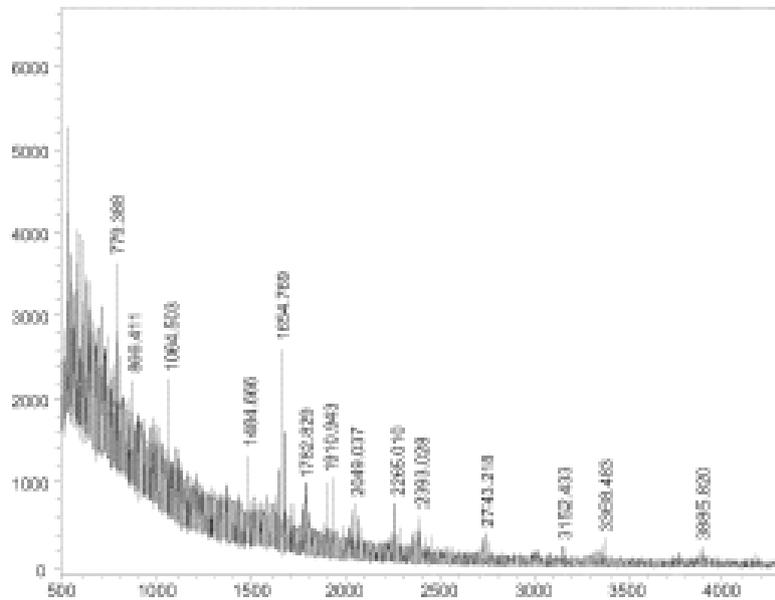


Fig. 4C

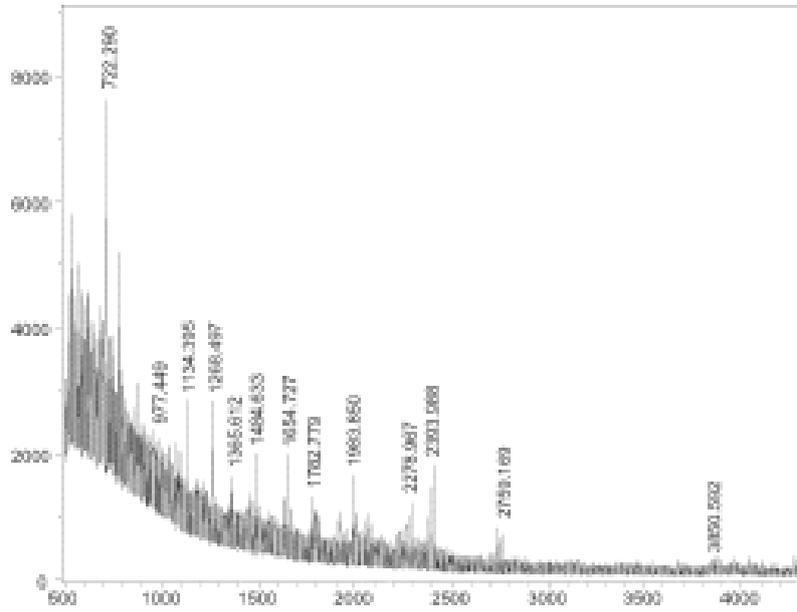


Fig. 5A

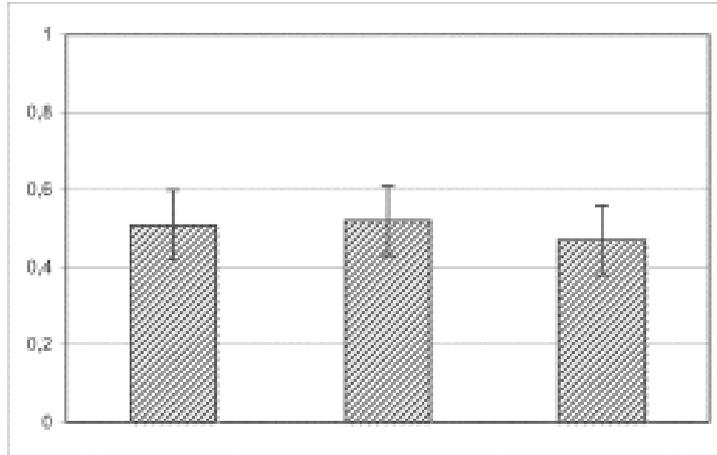


Fig. 5B

