

COLÁGENO HIDROLIZADO PARA UTILIZARSE EN LA REDUCCIÓN DE LA GLUCOSA EN SANGRE

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere a un ingrediente activo y uso del mismo para mejorar la hiperglucemia y las afecciones asociadas con la hiperglucemia. El ingrediente activo de la presente invención es adecuado como un suplemento alimenticio.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cuerpo humano depende de un control estricto de su nivel de glucosa en sangre para su funcionamiento normal.

Una alteración en los niveles normales de glucosa en sangre puede conducir a enfermedades tales como síndrome metabólico, enfermedad cardiovascular, daño nervioso e insuficiencia renal, entre otros. Las condiciones asociadas con niveles anormales de insulina y/o sensibilidad a la insulina (por ejemplo, diabetes tipo 2, obesidad) están estrechamente relacionadas con el desarrollo de hiperglucemia.

La regulación de la glucosa en sangre implica la interacción de diferentes órganos (por ejemplo, páncreas, cerebro, hígado, intestino, tejido adiposo y muscular) en parte a través de la liberación de varias hormonas.

La insulina y el glucagón son hormonas peptídicas que contrarrestan las acciones de cada una para equilibrar el nivel de azúcar en sangre. En respuesta a altos niveles de glucosa en sangre, las células beta pancreáticas secretan insulina en la sangre. Esto posteriormente disminuye los niveles de glucosa en sangre al promover la absorción de la glucosa de la sangre en las células del hígado, la grasa y el músculo esquelético. El glucagón se secreta por medio de las células alfa pancreáticas. El glucagón aumenta el hígado para convertir el glucógeno almacenado en glucosa, que se libera en el torrente sanguíneo.

El tratamiento de primera línea de hiperglucemia implica inicialmente cambios en el estilo de vida que pueden aliviar uno o más factores de riesgo de la hiperglucemia. Éstos normalmente incluyen cambios en el estilo de vida dirigidos a la resistencia a la insulina, diabetes, obesidad, o hipertensión. Con frecuencia, los cambios en el estilo de vida por sí solos son insuficientes, lo que requiere que se incluya el tratamiento con metformina y/o insulina como parte del tratamiento de primera línea.

En un grupo grande de individuos, el tratamiento de primera línea descrito arriba, no

alivia lo suficiente la hiperglucemia. Como posible tratamiento de segunda línea, actualmente se están desarrollando y probando nuevas clases de medicamentos para reducir la glucosa (Davies et al. Diabetes Care 2018;41(12):2669–2701).

Las nuevas clases de medicamentos para reducir la glucosa en sangre incluyen aquellos que se dirigen a la actividad de las incretinas. Las incretinas son hormonas metabólicas que aumentan la secreción de la insulina y/o inhiben la secreción de glucagón en una manera dependiente de la glucosa para disminuir los niveles de azúcar en sangre. El péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) se considera una de las incretinas más importantes y por lo tanto es un objetivo importante en las estrategias novedosas para mejorar la hiperglucemia. Aunque los agonistas del receptor del GLP-1 han demostrado eficacia clínica (Trujillo et al. Ther Adv Endocrinol Metab. 2021 Mar 9;12:2042018821997320), tienen varias limitaciones que obstaculizan su uso generalizado. En primer lugar, provocan varios efectos secundarios, incluyendo: pancreatitis, cáncer de páncreas o enfermedad ósea (Storgaard et al. Diabetes Obes Metab 2017;19:906–908), y efectos secundarios relacionados con el sistema gastrointestinal, como náuseas, vómitos y diarrea. En segundo lugar, el tratamiento del agonista del receptor del GLP-1 requiere inyecciones subcutáneas repetidas, que conducen al malestar en el paciente y reacciones en el lugar de la inyección (Trujillo et al. Ther Adv Endocrinol Metab. 2021 Mar 9;12:2042018821997320).

Otro ejemplo de un nuevo medicamento para reducir la glucosa en sangre es la sitagliptina. La sitagliptina es un inhibidor selectivo de la dipeptidil peptidasa IV (DPPIV). DPPIV afecta la hidrólisis de las hormonas incretinas. Al hacerlo, la sitagliptina puede incrementar las concentraciones plasmáticas de la forma activa de las incretinas, tal como el GLP-1 y el polipéptido inhibidor gástrico (GIP). Esto incrementa la liberación de insulina y disminuye la concentración de glucagón. Sin embargo, el médico profesional sigue dudando en prescribir sitagliptina a un paciente. Esto se debe en gran medida a sus varios efectos secundarios y contraindicaciones, por ejemplo, hasta el 10% de los pacientes experimentan complicaciones tales como hipoglucemia, dolor de cabeza, infecciones de las vías respiratorias y nasofaringitis.

Los péptidos de colágeno también se han sugerido para reducir la glucosa en sangre. JP2009235064 describe un péptido de colágeno que reduce la glucosa en sangre obtenido al tratar estrellas de mar con una proteasa y JP2012116773 describe un péptido de colágeno que incrementa el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) que se puede obtener al tratar el colágeno derivado de escamas de pescado y/o piel de pescado con una enzima proteolítica.

Sigue existiendo una necesidad insatisfecha de ingredientes activos que mejoren de manera más efectiva y/o segura la hiperglucemia. Dicho ingrediente activo se puede utilizar además o como una alternativa para el tratamiento de primera y/o segunda línea de individuos que tienen (o están en riesgo de tener) hiperglucemia. La presente invención tiene como objetivo proporcionar dicho

ingrediente activo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 Los inventores descubrieron que la hidrólisis enzimática de un material de partida que contiene colágeno con una combinación de dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa produce una composición con una potente actividad reductora de glucosa. La actividad reductora de glucosa parece ser más alta cuando las tres enzimas mencionadas anteriormente se utilizan para la hidrólisis.

10 En un aspecto, la presente invención se refiere al colágeno hidrolizado para usarse en la disminución de glucosa en sangre, en donde el colágeno hidrolizado se obtiene por hidrólisis enzimática de un material que contiene colágeno con una combinación de enzimas que comprende dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a colágeno hidrolizado para su uso (adicional) en la mejora de la hiperglucemia o un factor de riesgo de hiperglucemia, en donde el colágeno hidrolizado se obtiene por hidrólisis enzimática de un material que contiene colágeno con una combinación de enzimas que comprende dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

20 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para obtener colágeno hidrolizado, que comprende:

- a) proporcionar un material que contiene colágeno en una formulación líquida; y
 - b) someter el material que contiene colágeno a una combinación de enzimas que comprende dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa, en donde el colágeno hidrolizado es preferiblemente para su
- 25 uso en la disminución de la glucosa en sangre y/o la mejora de la hiperglucemia.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un colágeno hidrolizado que se obtiene por medio del método como se describe en la presente, en donde el colágeno hidrolizado es preferiblemente para utilizarse en la disminución de la glucosa en sangre y/o la mejora de

30 hiperglucemia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Aspectos de la invención

35 En un aspecto, la presente invención se refiere al colágeno hidrolizado para usarse en

la disminución de glucosa en sangre, en donde el colágeno hidrolizado se obtiene por hidrólisis enzimática de un material que contiene colágeno con una combinación de enzimas, que comprende preferiblemente dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

5 En un aspecto, la presente invención se refiere al colágeno hidrolizado para uso en la mejora de la hiperglucemia, en donde el colágeno hidrolizado se obtiene por hidrólisis enzimática de un material que contiene colágeno con una combinación de enzimas, que comprende preferiblemente dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para obtener colágeno hidrolizado, que comprende:

a) proporcionar un material que contiene colágeno en una formulación líquida; y

b) someter el material que contiene colágeno a una combinación de enzimas que comprende preferiblemente dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa, en donde el colágeno hidrolizado es preferiblemente para su uso en la disminución de la glucosa en sangre y/o la mejora de la hiperglucemia como se enseña en la presente.

15

En un aspecto, la presente invención se refiere a un colágeno hidrolizado que se obtiene por medio del método como se describe en la presente, en donde el colágeno hidrolizado es preferiblemente para utilizarse en la disminución de la glucosa en sangre y/o la mejora de hiperglucemia como se enseña en la presente.

20

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para disminuir la glucosa en sangre, el método comprende administrar a un sujeto un colágeno hidrolizado obtenido por hidrólisis enzimática de un material que contiene colágeno con una combinación de enzimas, que comprende preferiblemente dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

25

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar hiperglucemia o un factor de riesgo de la hiperglucemia, el método comprende administrar a un sujeto un colágeno hidrolizado obtenido por medio de hidrólisis enzimática de un material que contiene colágeno con una combinación de enzimas, que comprende preferiblemente dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

30

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de colágeno hidrolizado para la fabricación de un medicamento para reducir la glucosa en sangre, en donde el colágeno hidrolizado se obtiene por medio de hidrólisis enzimática de un material que contiene colágeno con una combinación de enzimas, que comprende preferiblemente dos o más enzimas seleccionadas del grupo

35

que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de colágeno hidrolizado para la fabricación de un medicamento para mejorar la hiperglucemia o un factor de riesgo de hiperglucemia, en donde el colágeno hidrolizado se obtiene por hidrólisis enzimática de un material que contiene colágeno con una combinación de enzimas, que comprende preferiblemente dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

Beneficios de la invención

- El uso de colágeno hidrolizado, por ejemplo como suplemento alimenticio, generalmente se considera seguro;

- Los inventores encontraron que el efecto reductor de la glucosa en sangre del colágeno hidrolizado de la invención fue similar al del compuesto medicinal sitagliptina. Por lo tanto el colágeno hidrolizado es una adición y/o alternativa valiosa para los compuestos medicinales que reducen la glucosa, ya que los compuestos medicinales por lo general provocan efectos secundarios y tienen contraindicaciones; y

- Los inventores encontraron que el efecto reductor de la glucosa en la sangre del colágeno hidrolizado de la invención comprende diferentes mecanismos de acción. Los mecanismos de acción incluyen el incremento del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) y la inhibición de la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV). Los diferentes efectos del colágeno hidrolizado parecen explicar la potente actividad reductora de la glucosa en sangre del colágeno hidrolizado *in vivo*. Además, la presencia de diferentes mecanismos de acción indica que el colágeno hidrolizado (también) puede ser adecuado para tratar efectos subyacentes de los niveles altos de glucosa en sangre (por ejemplo, en una población diferente de sujetos y/o en diferentes etapas de hiperglucemia);

- Los inventores establecieron los efectos benéficos del colágeno hidrolizado en ratones saludables (es decir, que muestran prevención de la hiperglucemia) y ratones obesos con hiperglucemia (es decir, que muestran tratamiento de la hiperglucemia). Esto demuestra que el colágeno hidrolizado de la invención es efectivo para mejorar la hiperglucemia tanto como prevención como tratamiento.

Azúcar en sangre e hiperglucemia

En una modalidad, la presente invención se refiere a un colágeno hidrolizado para usarse en la disminución de glucosa en sangre, en donde el colágeno hidrolizado se obtiene por hidrólisis enzimática de un material que contiene colágeno con una combinación de enzimas, en donde la combinación de enzimas comprende dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en

una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

En una modalidad preferida, la presente invención se refiere a un colágeno hidrolizado para usarse en la disminución de glucosa en sangre, en donde el colágeno hidrolizado se obtiene por hidrólisis enzimática de un material que contiene colágeno con una combinación de enzimas que
5 comprende una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

En una modalidad preferida, la combinación de enzimas como se describe en la presente comprende una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

Preferiblemente, el colágeno hidrolizado como se describe en la presente, se utiliza como un ingrediente activo. Más preferiblemente, el colágeno hidrolizado como se describe en la
10 presente se utiliza como un ingrediente activo para reducir la glucosa en sangre como se describe en la presente y/o como ingrediente activo para mejorar la hiperglucemia como se describe en la presente.

El término "glucosa en sangre" (es decir, nivel de glucosa en la sangre) como se utiliza en la presente se puede utilizar de manera intercambiable con "azúcar en la sangre". La "glucosa en sangre" se expresa típicamente, y preferiblemente, como milimoles por litro (mmol/l) y/o como
15 miligramos por decilitro (mg/dl). La glucosa en sangre por lo general y preferiblemente, se determina en un individuo en ayunas. En una modalidad, "un individuo en ayunas" significa un individuo que no ha comido durante por lo menos ocho horas.

En una modalidad, el colágeno hidrolizado como se describe en la presente está destinado a utilizarse (además) en la mejora de la hiperglucemia.

El término "sangre" se puede utilizar en la presente de manera intercambiable con el
20 término "plasma" cuando se hace referencia a un nivel de una molécula. Por ejemplo "glucosa en sangre" también puede leerse como "glucosa en plasma". Por ejemplo, "GLP-1 en sangre" también puede leerse como "GLP-1 en plasma".

El término "hiperglucemia" como se utiliza en la presente significa un nivel alto de
25 glucosa en sangre. En la presente, se considera que la escala normal de glucosa en sangre en individuos en ayunas es 80 - 110 mg/dl. En la presente, un individuo con un nivel de glucosa en sangre de 126 mg/dl o más tiene hiperglucemia. En general, se considera que un individuo tiene una tolerancia alterada a la glucosa, o prediabetes, con una glucosa en sangre en ayunas de 111-125 mg/dL. En la presente se considera que los individuos con "tolerancia a la glucosa alterada" o "prediabetes" tienen
30 hiperglucemia.

En una modalidad, la "hiperglucemia" como se describe en la presente es aguda, que por lo general se caracteriza por la necesidad de administración directa de insulina.

En una modalidad, la "hiperglucemia" como se describe en la presente es crónica y/o requiere terapia hipoglucémica prolongada, ya sea en combinación o no con cambios en el estilo de
35 vida. La "hiperglucemia" como se describe en la presente es preferiblemente hiperglucemia crónica.

En el contexto de la presente invención, un método preferido para medir la hiperglucemia es la prueba de hemoglobina A1c (HbA1c), que determina la hemoglobina glucosilada. El experto en la técnica conoce las formas más aceptadas y/o más precisas de medir la HbA1c, sin embargo, los métodos analíticos preferidos utilizados para medir HbA1c incluyen la cromatografía de
5 afinidad, el inmunoensayo, la cromatografía de intercambio catiónico y/o la electroforesis capilar.

En una modalidad, la hiperglucemia como se describe en la presente incluye "hiperglucemia postprandial". La "hiperglucemia postprandial" se define en el contexto de la invención como una glucosa postprandial excesivamente alta. Como se utiliza en la presente, el término "nivel de glucosa postprandial" (nivel de PPG) se refiere a la cantidad de glucosa en la sangre después de
10 una comida. En individuos sanos o no diabéticos, los niveles de glucosa en sangre alcanzan su punto máximo aproximadamente una hora después del comienzo de una comida y, por lo general, no superan los 140 mg/dl, y vuelven a los niveles preprandiales en un plazo de 2 a 3 horas. Estos perfiles de tiempo suelen ser diferentes en pacientes diabéticos o pacientes que padecen una condición patológica diferente. En una modalidad, el nivel de PPG se mide después de 2 horas del inicio de la comida, sin
15 embargo, otro momento puede ser más adecuado dependiendo de cuándo se localizan (o se espera que se localicen) típicamente los valores máximos. Los niveles aceptables de PPG, el nivel umbral de PPG que define la hiperglucemia postprandial y el método óptimo para medir el nivel de PPG pueden variar entre los profesionales médicos. En el contexto de la presente invención, un nivel de PPG es considerado excesivo/muy alto (es decir, hiperglucemia postprandial) cuando se encuentra por arriba
20 de 140 mg/dl para un adulto menor de 50 años, cuando se encuentra por arriba de 150 mg/dl para un individuo entre 50 y 60 años, y cuando se encuentra por arriba de 160 mg/dl para un individuo de más de 60 años.

La presente invención puede referirse a un uso no terapéutico y/o a un uso terapéutico del colágeno hidrolizado, en el que la distinción se basa en el nivel de glucosa en sangre y/o en los
25 grupos distintivos de sujetos que experimentan un incremento de la glucosa en sangre.

El primer grupo (en la presente el "grupo de sujetos saludables") comprende personas saludables que no reciben beneficio terapéutico del tratamiento con el colágeno hidrolizado de la invención, tal como cuando los niveles de glucosa en sangre no son excesivos ni tan graves como para
esperar que provoquen problemas de salud o sufrimiento (grave). Además o alternativamente, la
30 glucosa en sangre puede tener una causa o una gravedad tal que el incremento de la glucosa en sangre desaparezca naturalmente con el tiempo (es decir, no es crónico). Además o como alternativa, los niveles de glucosa en sangre no pueden ser demasiado excesivos o severos en el grupo de sujetos saludables, de modo que generalmente no buscarían ayuda de un médico profesional.

El segundo grupo (en la presente el "grupo de sujetos patológicos") comprende
35 sujetos en donde un incremento en el nivel de glucosa en sangre es de una naturaleza patológica, lo

que significa que el nivel incrementado de glucosa en sangre por lo general provoca síntomas graves de dolor y sufrimiento (severo) y/o puede dar lugar a riesgos (graves) para la salud y psicológicos. Además, el nivel incrementado de glucosa en sangre puede ser crónico en el grupo de sujetos patológicos. La gravedad del incremento de glucosa en sangre es tal que generalmente se busca la ayuda de un médico profesional.

El médico profesional normalmente es capaz de determinar caso por caso si los cambios en los niveles de glucosa en sangre requieren una intervención terapéutica o no terapéutica (es decir, si una persona se encuentra en el grupo de sujetos saludables o en el grupo de sujetos patológicos). El médico profesional, por ejemplo, puede establecer si los cambios de la glucosa en sangre pueden provocar riesgos (graves) para la salud y la psicología y/o si se trata de un cambio crónico en la glucosa en sangre.

Dependiendo de si un individuo está sano o experimenta una condición médica (por ejemplo, hiperglucemia, diabetes, obesidad), una mejora de la glucosa postprandial puede considerarse una intervención terapéutica o no terapéutica, respectivamente. Además o alternativamente, dependiendo de la cantidad de glucosa en la sangre después de una comida, una mejora de la glucosa postprandial puede considerarse una intervención terapéutica o no terapéutica. Por ejemplo, en individuos sanos la cantidad de glucosa después de una comida normalmente no excede 140 mg/dl, por lo tanto, la mejora de un nivel de glucosa postprandial por debajo de 140 mg/dl podría considerarse una intervención no terapéutica. Por ejemplo, en individuos que experimentan una condición médica (por ejemplo, hiperglucemia, diabetes, obesidad), la cantidad de glucosa después de una comida normalmente puede ser 140 mg/dl o más, por lo tanto la mejora de un nivel de glucosa postprandial de 140 mg/dl o más podría considerarse una intervención terapéutica.

En una modalidad, el colágeno hidrolizado se utiliza para reducir terapéuticamente la glucosa en sangre, como para mejorar la hiperglucemia o un factor de riesgo de hiperglucemia. En una modalidad, el colágeno hidrolizado es para reducir no terapéuticamente la glucosa en sangre, tal como para mejorar la glucosa postprandial.

En una modalidad, el colágeno hidrolizado es para mejorar de forma no terapéutica la glucosa postprandial, en donde el nivel de glucosa postprandial es preferiblemente inferior a 140 mg/dl, más preferiblemente inferior a 120 mg/dl, incluso más preferiblemente inferior a 100 mg/dl (es decir, antes del inicio de la intervención con el colágeno hidrolizado). En una modalidad, el colágeno hidrolizado es para mejorar de forma terapéutica la glucosa postprandial, en donde el nivel de glucosa postprandial es preferiblemente por lo menos 140 mg/dl, más preferiblemente por lo menos 160 mg/dl, incluso más preferiblemente por lo menos 180 mg/dl (es decir, antes de comenzar la intervención con el colágeno hidrolizado).

En una modalidad, el colágeno hidrolizado como se describe en la presente está

destinado a utilizarse (además) en la mejora de un factor de riesgo para la hiperglucemia.

El efecto benéfico del colágeno hidrolizado de la invención se demostró en ratones sanos en donde la hiperglucemia se indujo después de recibir colágeno hidrolizado. El efecto benéfico del colágeno hidrolizado de la invención también se demostró en ratones obesos con hiperglucemia a los que se les administró colágeno hidrolizado. Esto demuestra que el colágeno hidrolizado de la invención es efectivo tanto en la prevención como en el tratamiento de hiperglucemia.

En el contexto de la presente invención, el término "mejorar" abarca tanto la "prevención" como el "tratamiento" de una condición. El término "prevención" significa asegurar que un sujeto no desarrollará una condición (por ejemplo, hiperglucemia o factor de riesgo para hiperglucemia). En la presente también se considera que una intervención es una forma de "prevenir" cuando se retrasa, se reduce en gravedad y/o se reduce la incidencia de una condición, incluso cuando no se evita por completo que la condición ocurra. Como se utiliza en la presente, "prevenir" o "prevención" por una intervención se entiende la situación en la que un sujeto ha experimentado previamente una condición (por ejemplo, hiperglucemia o un factor de riesgo de hiperglucemia), pero una intervención evita que la condición vuelva a presentarse. El "prevenir" o la "prevención" puede tener un efecto terapéutico y/o no terapéutico. Si el "prevenir" o la "prevención" es de naturaleza terapéutica, también se puede dirigir a un síntoma de una enfermedad o condición y/o su patología subyacente. El "prevenir" o la "prevención" puede definirse por cualquier retraso, cambio en la gravedad y/o cambio en la incidencia, como por ejemplo de por lo menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 %, entre, en comparación con un control o referencia medido por cualquier técnica estándar. En el contexto de la presente invención "tratar" significa que una intervención reduce y/o cura una condición (por ejemplo, hiperglucemia o un factor de riesgo para hiperglucemia) una vez que la condición ya existe. El "tratamiento" puede tener un efecto terapéutico y/o no terapéutico. Si el "tratamiento" es de naturaleza terapéutica, se puede dirigir a un síntoma de una enfermedad o condición y/o su patología subyacente. El tratamiento puede ser, por ejemplo, cualquier reducción en la gravedad, incidencia y/o frecuencia de la condición, tal como de por lo menos el 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 95%, o 100%, en comparación con un control o referencia medido mediante cualquier técnica estándar. Como se utiliza en la presente, "mejorar" también abarca "curar". El término "mejorar" se puede utilizar en la presente de manera intercambiable con "reducir" o "disminuir".

Como se utiliza en la presente, un "factor de riesgo para hiperglucemia" significa una condición que se relaciona con una mayor probabilidad de desarrollar hiperglucemia. En individuos con un factor de riesgo para hiperglucemia, es factible administrar un agente reductor de glucosa en sangre como profilaxis en la prevención de la hiperglucemia. Además o alternativamente, en individuos con un factor de riesgo para hiperglucemia, es preferible administrar un agente reductor de glucosa en

sangre como profilaxis para mejorar la hiperglucemia que puede desarrollarse. Por ejemplo, la obesidad es un factor de riesgo para la hiperglucemia. La administración de un agente reductor de glucosa en sangre a un individuo obeso puede prevenir la hiperglucemia en dicho individuo obeso y/o mejorar la hiperglucemia en dicho individuo si se desarrolla.

5 Puede haber varios factores de riesgo para desarrollar hiperglucemia. En el contexto de la presente invención, un nivel muy bajo de insulina en el cuerpo, defectos en la acción de la insulina y/o resistencia a la insulina se consideran factores de riesgo para la hiperglucemia. En la presente descripción, la diabetes tipo 2 es considerada un factor de riesgo para hiperglucemia. Además o alternativamente, una o más de las siguientes condiciones son consideradas en la presente factores de riesgo para desarrollar hiperglucemia: diabetes gestacional, índice de masa corporal (BMI, por sus siglas en inglés) elevado, obesidad e hiperglucagonemia.

10 Varias hormonas actúan para incrementar los niveles de glucosa en sangre hiperglucemia cuando están presentes en exceso y se consideran en la presente factores de riesgo de hiperglucemia, incluyendo el exceso de uno o más de los siguientes: cortisol, catecolaminas, hormona del crecimiento, glucagón y hormonas tiroideas.

15 En una modalidad preferida, el factor de riesgo para hiperglucemia como se describe en la presente, es resistencia a la insulina. El término 'resistencia a la insulina' como se utiliza en la presente abarca todas las condiciones diagnosticadas como 'resistencia a la insulina' por un médico profesional. El término 'resistencia a la insulina' como se utiliza en la presente se refiere preferiblemente a la resistencia periférica a la insulina y/o resistencia hepática a la insulina. La resistencia a la insulina se diagnostica preferiblemente por el estándar de oro que es la "pinza hiperinsulinémica-euglucémica" (DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R, Am J Physiol. 1979 Sep;237(3):E214-23). Este método mide la cantidad de glucosa necesaria para compensar un nivel incrementado de insulina sin provocar hipoglucemia. El procedimiento puede tomar dos horas e

20 implica preferiblemente los siguientes pasos (o pasos similares): A través de una vena periférica, la insulina se infunde a 10–120 mU por m² por minuto. Con el fin de compensar la infusión de insulina, la glucosa (20%) se infunde para mantener los niveles de azúcar en sangre entre 5 y 5.5 mmoles/L. La velocidad de infusión de glucosa se determina controlando los niveles de azúcar en sangre cada cinco a diez minutos (Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ, Enero 2008, American Journal of

25 Physiology. Endocrinology and Metabolism. 294 (1): E15–26). La velocidad de la infusión de glucosa durante los últimos treinta minutos de la prueba determina la sensibilidad a la insulina. Si se requieren altos niveles (7.5 mg/min o más altos), el paciente es sensible a la insulina. Bajos niveles (4.0 mg/min o más bajos) indican resistencia a la insulina. Los niveles entre 4.0 y 7.5 mg/min no son definitivos y sugieren "tolerancia a la glucosa alterada", un signo temprano de resistencia a la insulina.

30 La evaluación del modelo homeostático para la resistencia a la insulina (HOMA o

HOMA-IR) es un método alternativo preferido para determinar y cuantificar la resistencia a la insulina en una condición de estado estable en ayunas, y se correlaciona con el estándar de oro (Véase, por ejemplo, Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985). *Diabetologia*. 28 (7): 412–9. Doi:10.1007/BF00280883. PMID 3899825; y/o A. S. Rudenski; D. R. Matthews; J. C. Levy; R. C. Turner (1991) *Metabolism*. 40 (9): 908–917). Un registro de HOMA(-IR) que se desvía de una escala de referencia puede indicar resistencia a la insulina HOMA(-IR) se ha aplicado ampliamente en estudios epidemiológicos y en investigaciones experimentales. HOMA(-IR) indica un valor que representa una estimación de la resistencia a la insulina, derivada de la división de los niveles de insulina y glucosa en la sangre de una persona. El valor de HOMA(-IR) se puede calcular por medio de la siguiente ecuación:

$$H = \frac{\text{Glucosa} \times \text{Insulina}}{405}$$

en donde H es el valor de HOMA(-IR) expresado en mg/dL, Glucosa representa niveles de glucosa en ayunas en la sangre expresados en mmol/L, Insulina representa los niveles de insulina en ayunas en la sangre expresados en mIU/L. IU (relativo a la actividad enzimática) es una abreviatura de Unidades Internacionales, también llamadas unidades enzimáticas. El experto en la técnica está familiarizado con los métodos utilizados para cuantificar estos niveles. La actividad enzimática es la cantidad del sustrato convertido por unidad de tiempo. Una IU equivale a la conversión de un μmol de sustrato por minuto. Para un individuo con sensibilidad normal a la insulina, HOMA(-IR) puede ser igual a 1. El límite superior de HOMA(-IR) normal se considera frecuentemente como 2.0, aunque el HOMA(-IR) normal puede depender de las características del subgrupo de población. En la presente descripción, se considera que un sujeto sano tiene un valor de HOMA-IR por debajo de 2.0 mg/dL, preferiblemente un valor de HOMA-IR por debajo de 1.9, 1.8, o 1.7 mg/dL, más preferiblemente un valor de HOMA-IR por debajo de 1.6, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1 mg/dL, y de manera más preferida un valor de HOMA-IR por debajo de 1.0. En la presente descripción, un nivel de insulina en suero en ayunas superior a 25 mU/L o 174 pmoles/L se considera un indicador de resistencia a la insulina.

Otros métodos también pueden ser adecuados para medir la resistencia a la insulina. En una modalidad, la sensibilidad o la resistencia a la insulina se mide con la “prueba de supresión de insulina” (IST). En una modalidad, la sensibilidad o resistencia a la insulina se mide con el “análisis del modelo mínimo de prueba de tolerancia a la glucosa intravenosa muestreada con frecuencia” (FSIVGTT). En una modalidad, la sensibilidad o resistencia a la insulina se mide con la “prueba de tolerancia a la glucosa oral” (OGTT).

En una modalidad preferida, el “factor de riesgo para hiperglucemia” como se describe en la presente es síndrome metabólico. El término ‘síndrome metabólico’ como se utiliza en la presente abarca todas las condiciones diagnosticadas como “síndrome metabólico” por un médico profesional. En una modalidad, el síndrome metabólico puede ser diagnosticado si un sujeto tiene por lo menos

dos, o por lo menos tres de los siguientes rasgos:

- Cintura grande — una cintura que mide por lo menos 89 centímetros para mujeres y 102 centímetros para hombres;

- Alto nivel de triglicéridos — 150 miligramos por decilitros (mg/dL), o 1.7 milimoles por litro (mmoles/L), o más de este tipo de grasa que se encuentra en la sangre;

- Colesterol "bueno" o HDL reducido — Menos de 40 mg/dL (1.04 mmoles/L) en hombres o menos de 50 mg/dL (1.3 mmoles/L) en mujeres de colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL);

- Presión arterial incrementada — 130/85 milímetros de mercurio (mm Hg) o superior;

- Azúcar en sangre en ayunas elevada — 100 mg/dL (5.6 mmoles/L) o mayor.

En una modalidad preferida, el factor de riesgo para hiperglucemia como se describe en la presente es diabetes tipo 2. El término "diabetes tipo 2" en la presente se puede utilizar de manera intercambiable con "diabetes mellitus tipo 2". En el contexto de la presente invención, los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 se caracterizan preferiblemente por un nivel alto de azúcar en sangre, resistencia a la insulina y falta relativa de insulina.

En una modalidad preferida, el factor de riesgo para hiperglucemia como se describe en la presente, es obesidad.

En una modalidad preferida, el factor de riesgo para hiperglucemia como se describe en la presente es sobrepeso.

Como se utiliza en la presente, el término "obesidad" significa una condición médica en donde la grasa corporal en exceso se ha acumulado hasta el punto de que puede tener un efecto adverso sobre la salud. En algunos casos, la obesidad es sólo una preocupación cosmética (que no requiere tratamiento terapéutico). El médico profesional puede establecer por uno o más medios si una persona es obesa. Por lo general, se considera que el índice de masa corporal (BMI) de 30.0 o superior indica la presencia de obesidad. En la presente descripción, un BMI de 25.0 a <30 indica que una persona tiene sobrepeso. "Sobrepeso" como se utiliza en la presente se refiere a una condición no médica caracterizada por una acumulación en exceso de grasa corporal.

Los inventores de la presente descubrieron que el colágeno hidrolizado de la invención puede tener una o más de las siguientes acciones, por ejemplo, como mecanismo de acción para reducir la glucosa en sangre y/o mejorar la hiperglucemia:

- incrementar el nivel de una o más incretinas en el cuerpo, tal como, al incrementar la secreción de una o más incretinas por las células gastrointestinales;

- disminuir el nivel de uno o más inhibidores de incretinas (por ejemplo, DPP-IV) en el cuerpo, tal como al disminuir la secreción de uno o más inhibidores de incretinas por las células gastrointestinales;

- incrementar GLP-1 en sangre, tal como por ejemplo mediante el incremento de la secreción de GLP-1 por las células gastrointestinales;

- disminuir el glucagón en sangre, tal como al disminuir la secreción de glucagón por medio de las células pancreáticas (alfa);

5 - incrementar la insulina en sangre, tal como al incrementar la secreción de insulina por medio de las células pancreáticas (beta);

- disminuir la absorción de glucosa en el intestino delgado; e

- incrementar la relación de insulina/glucosa en sangre.

10 En una modalidad preferida, el colágeno hidrolizado como se describe en la presente es para utilizarse (además) en uno o más seleccionados del grupo que consiste en:

- mejorar el GLP-1 en sangre, preferiblemente incrementar el GLP-1 en sangre;

- mejorar del glucagón en sangre, preferiblemente disminuir el glucagón en sangre;

- mejorar la insulina en sangre, preferiblemente incrementar la insulina en sangre;

15 relación de insulina/glucosa en sangre;

- mejorar el nivel de DPP-IV en el cuerpo, preferiblemente disminuir el nivel de DPP-IV en el cuerpo, tal como al disminuir la secreción de DPP-IV por las células gastrointestinales;

20 - mejorar el nivel de una o más incretinas en el cuerpo, preferiblemente incrementar el nivel de una o más incretinas en la sangre, tal como al incrementar la secreción de una o más incretinas por medio de las células gastrointestinales;

- mejorar la absorción de glucosa en el intestino delgado, preferiblemente disminuir la absorción de glucosa en el intestino delgado.

25 Los inventores de la presente encontraron que el colágeno hidrolizado de la invención tiene una capacidad particularmente alta para estimular la secreción de GLP-1 y/o reducir la glucosa en sangre. La actividad biológica parece estar relacionada con el peso molecular específico y/o la distribución del peso molecular del colágeno hidrolizado que se obtiene mediante hidrólisis con la combinación específica de enzimas.

30 En una modalidad preferida, el colágeno hidrolizado es capaz de estimular la secreción de GLP-1. La capacidad de estimular la secreción de GLP-1 es preferiblemente en células STC-1. La capacidad de estimular la secreción de GLP-1 se demuestra preferiblemente utilizando el siguiente protocolo:

-someter la gelatina a hidrólisis para obtener una formulación de colágeno hidrolizado;

35 -someter la formulación de colágeno hidrolizado a digestión gastrointestinal simulada (SGID) para obtener colágeno hidrolizado digerido, preferiblemente de acuerdo con el protocolo descrito en Song et al. (Food Funct. 2020 Jun 24;11(6):5553-5564);

-estimular las células (por ejemplo, células STC-1) con el colágeno hidrolizado digerido o con un blanco como referencia, preferiblemente de acuerdo con el protocolo descrito por Qi et al. (Bio Protoc. 2020 Ago 20; 10(16): e3717). Las células se estimulan preferiblemente a una concentración en la escala de 1-20 mg/ml, preferiblemente a 10 mg/ml;

- 5 - los sobrenadantes se recolectaron 1-3 h después de iniciar la estimulación y los niveles de GLP-1 se determinaron en el sobrenadante, por ejemplo, por inmunoensayo enzimático.

Un protocolo particularmente adecuado es el protocolo descrito para la estimulación de las células STC-1 en el Ejemplo 1 de la presente descripción.

- 10 La capacidad de estimular la secreción de GLP-1 se define preferiblemente de acuerdo con un incremento de por lo menos 100 veces, preferiblemente de 500 veces, más preferiblemente de 1000 veces, incluso más preferiblemente de 2000 veces, más preferiblemente de 5000 veces, en el nivel de GLP-1 después de la estimulación, preferiblemente con relación a la estimulación con un grupo de referencia en blanco (grupo de control).

15 Colágeno hidrolizado

- Como se utiliza en la presente, el "colágeno hidrolizado" es una mezcla de cadenas cortas de aminoácidos derivadas de un material de partida que contiene colágeno que tiene un colágeno nativo (de longitud completa), generalmente a través de pasos de hidrólisis, incluyendo la hidrólisis enzimática (también llamada hidrolización enzimática). El grado de hidrólisis por lo general tiene un impacto en el peso molecular promedio del producto final. El colágeno hidrolizado por lo
- 20 general tiene un peso molecular de 1-10 kDa. El colágeno hidrolizado como se enseña en la presente invención puede comprender colágeno que es hidrolizado o parcialmente hidrolizado. El término "hidrolizado de colágeno" puede ser utilizado de manera intercambiable y ser sinónimo con los términos "colágeno hidrolizado" o "péptido de colágeno".

- 25 El colágeno hidrolizado puede ser producido de un material de partida que contiene colágeno (tal como un tejido conectivo de un animal) en un proceso de un paso o por medio de la etapa intermedia de gelatina, en la que se puede utilizar gelatina de tipo A y/o de tipo B. El colágeno hidrolizado como se utiliza en la presente de este modo se puede referir a la gelatina hidrolizada, que se obtiene por hidrólisis de la gelatina obtenida del colágeno. Los términos "colágeno hidrolizado" y
- 30 "gelatina hidrolizada" se pueden utilizar de manera intercambiable en la presente descripción. La gelatina hidrolizada se obtiene preferiblemente por hidrólisis enzimática o química de la gelatina. La gelatina hidrolizada se puede obtener de la gelatina de tipo A, gelatina de tipo B o mezclas de las mismas. El término "colágeno hidrolizado" puede ser utilizado de manera intercambiable y ser sinónimo con el término "gelatina hidrolizada".

- 35 En una modalidad preferida, el material que contiene colágeno es gelatina.

El colágeno en la presente puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en colágeno de tipo I, colágeno de tipo II, colágeno de tipo III, colágeno de tipo V y colágeno de tipo X.

Preferiblemente, el colágeno hidrolizado como se describe en la presente, se deriva de uno o más tipos de colágeno seleccionados del grupo que consiste en colágeno de tipo I, colágeno de tipo II, y colágeno de tipo III. Además o alternativamente, el colágeno hidrolizado como se describe en la presente se deriva preferiblemente de una materia prima animal que comprende diferentes tipos de colágeno, como dos o más de los siguientes: colágeno de tipo I, colágeno de tipo II y colágeno de tipo III. Además o alternativamente, el colágeno hidrolizado como se describe en la presente puede ser una mezcla que comprende dos o más del colágeno de tipo I, de tipo II, y de tipo III.

El colágeno hidrolizado como se describe en la presente se deriva preferiblemente de un colágeno de tipo I y/o colágeno de tipo II.

El colágeno como se describe en la presente se puede derivar de cualquiera o más de los animales o especies de animales, tal como especies bovinas, especies porcinas y especies de peces. Un "animal" en la presente se puede referir a cualquier animal capaz de proporcionar un tejido conectivo, del cual el tejido conectivo se puede utilizar para preparar colágeno hidrolizado.

En una modalidad, el colágeno, como se enseña en la presente, se deriva de una vaca. En una modalidad, el colágeno, como se enseña en la presente, se deriva de un cerdo. En una modalidad, el colágeno, como se enseña en la presente se deriva de un pez.

En varias modalidades, el colágeno como se describe en la presente es una mezcla de colágeno de diferentes fuentes, como colágeno que se origina de múltiples especies animales y/o colágeno que se origina de diferentes tejidos. Por ejemplo, el colágeno como se describe en la presente puede ser una mezcla de dos o más colágenos elegidos del grupo que consiste en colágeno de pescado, colágeno porcino y colágeno bovino. Además o alternativamente, el colágeno puede ser una mezcla de colágeno elegido de colágeno derivado de la piel, cartílago, hueso y/o tejido conectivo.

El término "cuero" tal como se utiliza en la presente significa la cubierta exterior de animales grandes, como los del grupo bovino o cualquier otro animal grande. El término "piel" como se utiliza en la presente significa la cubierta exterior de animales pequeños como ciervos, cabras, ovejas, etc. Los términos "piel" y "cuero" pueden usarse de manera intercambiable en la presente y pueden referirse a la cubierta exterior de un animal, independientemente de su tamaño.

El "tejido conectivo" como se describe en la presente pueden ser uno o más tipos elegidos del grupo que consiste en tejido conectivo del cuerpo calloso, piel, cornamenta, protuberancias (por ejemplo, jorobas), cuernos, cabeza, cerebro, cuello, oreja, ojo, nariz, lengua, labio, boca, esófago, tráquea, extremidades, pies, dedos, palmas, garras, huesos, cartílagos, médula ósea, articulaciones, membranas, trasero, ligamentos, tendones, costillas, diafragma, músculos, músculo

esquelético, músculo liso, intestino, vasos sanguíneos, vejiga, estómago, aorta, corazón, hígado, riñón, tórax, pulmón, bazo, páncreas, óvulo, esperma, testículo, ovario, nervio, vesícula biliar y abdomen.

En una modalidad, el colágeno, como se enseña en la presente, se deriva de la piel y/o tejido conectivo de la piel. En una modalidad preferida, el colágeno, como se enseña en la presente, se deriva del cartílago. En una modalidad preferida, el colágeno, como se enseña en la presente, se deriva del hueso. El colágeno como se describe en la presente puede ser una mezcla de dos o más colágenos seleccionados del grupo que consiste en colágeno de piel, colágeno cartílago y colágeno de hueso.

En una modalidad preferida, el colágeno como se describe en la presente se deriva de uno o más tejidos seleccionados del grupo que consiste en piel, escamas, cartílagos, huesos, tendones, ligamentos y tejido conectivo.

En una modalidad preferida, el colágeno como se describe en la presente, es uno o más tipos seleccionados del grupo que consiste en colágeno porcino, colágeno bovino y colágeno de pescado.

15

Hidrólisis enzimática

En una modalidad, la presente invención se refiere a un método para obtener colágeno hidrolizado, que comprende

- a) proporcionar un material que contiene colágeno en una formulación líquida; y
- b) someter el material que contiene colágeno a una combinación de enzimas, que comprende preferiblemente dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

En una modalidad preferida, la presente invención se refiere a un método para obtener colágeno hidrolizado, que comprende

- a) proporcionar un material que contiene colágeno en una formulación líquida; y
- b) someter el material que contiene colágeno a una combinación de enzimas que comprenden una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

Preferiblemente, el paso b) del método como se describe en la presente es, o abarca, un paso de hidrólisis enzimática.

Como se utiliza en la presente, la "formulación líquida" es una formulación en donde el material que contiene colágeno es por lo menos en parte soluble. Además o alternativamente, la "formulación líquida" es una formulación en donde un material que contiene colágeno permanece por lo menos en parte soluble después de someterse a un paso de disolución. La formulación líquida como se describe en la presente es preferiblemente una formulación acuosa. En una modalidad preferida, la formulación líquida como se describe en la presente es o comprende agua, más preferiblemente la

formulación líquida o comprende agua destilada y/o agua desmineralizada.

Como parte del método como se describe en la presente, el material que contiene colágeno se puede proporcionar en la formulación líquida en una cantidad de por lo menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, o 65% en p. (% en peso). Además o alternativamente, el material que
5 contiene colágeno se puede proporcionar en la formulación líquida en una cantidad de no más de 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, o 10% en peso.

En una modalidad, el material que contiene colágeno se proporciona en la formulación líquida como se describe en la presente en una cantidad de 20-50% en peso, preferiblemente 30-40% en peso.

10 En una modalidad, la combinación de enzimas como se describe en la presente es una mezcla de dichas enzimas.

En una modalidad, la combinación de las enzimas como se describe en la presente, comprende una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

15 En una modalidad, la combinación de las enzimas como se describe en la presente, comprende dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

En una modalidad, la combinación de enzimas como se describe en la presente comprende una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

20 En una modalidad, la combinación de enzimas como se describe en la presente comprende una proteasa neutra y carboxipeptidasa. En una modalidad, la combinación de enzimas como se describe en la presente comprende una proteasa neutra y una aminopeptidasa. En una modalidad, la combinación de enzimas como se describe en la presente comprende una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

25 En una modalidad preferida, la combinación de enzimas como se describe en la presente, comprende una proteasa neutra, y una o ambas de una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

El término "proteasa neutra" como se utiliza en la presente significa una clase de proteasas que pueden actuar en catálisis en un entorno neutro, débilmente ácido o débilmente alcalino
30 para catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas. En la presente descripción, el pH óptimo para una proteasa neutra en hidrólisis enzimática es considerado entre 6.0 y 7.5. Las proteasas neutras se pueden dividir en cuatro categorías principales dependiendo del mecanismo catalítico y el grupo funcional del sitio activo: serina proteasa, proteasa aspártica, cisteína proteasa y metaloproteasa.

35 Como se utiliza en la presente, una "serina proteasa" significa una enzima que rompe

enlaces peptídicos en proteínas o péptidos, en donde la serina actúa como el aminoácido nucleofílico en el sitio activo. La serina proteasa que se describe en la presente puede ser una serina proteasa similar a la quimotripsina (similar a la tripsina). Además o como alternativa, la serina proteasa como se describe en la presente puede ser una serina proteasa similar a la subtilisina.

5 Como se utiliza en la presente, una "proteasa aspártica" significa un tipo catalítico de enzimas proteasas que utiliza una molécula de agua activada unida a uno o más residuos de aspartato para la catálisis de una proteína o un péptido.

 Como se utiliza en la presente, una "cisteína proteasa" significa una proteasa con un mecanismo catalítico que implica un tiol de cisteína nucleófilo en una tríada o díada catalítica para la
10 catálisis de una proteína o un péptido. Las "cisteína proteasas" en la presente se pueden utilizar de manera intercambiable con "proteasas de tiol".

 Como se utiliza en la presente, una "metaloproteasa" significa una proteasa para la cual el mecanismo catalítico implica un metal tal como zinc o cobalto. En la presente descripción, la metaloproteasa es preferiblemente una proteasa dependiente de zinc.

15 El término "carboxipeptidasa" como se utiliza en la presente significa una enzima proteasa que hidroliza un enlace peptídico en el extremo carboxiterminal (C-terminal) de una proteína o un péptido. Las carboxipeptidasas normalmente se clasifican en una de varias familias que se basan en su mecanismo de sitio activo. En una modalidad, la carboxipeptidasa en la presente es una metalocarboxipeptidasa, es decir, una carboxipeptidasa que utiliza un metal en el sitio activo para el
20 mecanismo catalítico.

 El término "aminopeptidasa" como se utiliza en la presente significa una enzima proteasa que escinde los enlaces peptídicos en la N-terminal de una proteína o péptido. En la presente descripción, la aminopeptidasa es preferiblemente una leucina aminopeptidasa. El término "leucina aminopeptidasa" como se utiliza en la presente significa una aminopeptidasa que cataliza
25 preferiblemente la hidrólisis de los residuos de leucina en la N-terminal de péptidos y proteínas.

 En una modalidad preferida, la proteasa neutra como se describe en la presente es una serina proteasa. En una modalidad preferida, la proteasa neutra como se describe en la presente es una proteasa aspártica. En una modalidad preferida, la proteasa neutra como se describe en la presente es una cisteína proteasa. En una modalidad preferida, la proteasa neutra como se describe
30 en la presente es una metaloproteasa. En una modalidad preferida, la aminopeptidasa como se describe en la presente es una leucina aminopeptidasa.

 La "enzima" en el contexto de la presente invención puede ser una enzima comercialmente disponible. En una modalidad, la combinación de enzimas como se describe en la presente es una mezcla de enzimas comercialmente disponible. En una modalidad, la combinación de
35 enzimas como se describe en la presente se obtiene comercialmente como "Sumizyme",

preferiblemente "Sumizyme FP-G".

En una modalidad, la enzima (por ejemplo, una o más enzimas en la combinación de enzimas) como se describe en la presente se deriva de un microorganismo.

En una modalidad, la enzima (por ejemplo, una o más enzimas en la combinación de enzimas) como se describe en la presente se deriva de un microorganismo del género *Aspergillus*, preferiblemente de *Aspergillus oryzae* y/o *Aspergillus melleus*.

En una modalidad, la enzima (por ejemplo, una o más enzimas en la combinación de enzimas) como se describe en la presente se deriva de un microorganismo del género *Bacillus* (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*).

En una modalidad, se utiliza una combinación de enzimas que no comprende más de una enzima derivada de *Bacillus sp.*, excluyendo de este modo las mezclas de endoproteasas de *Bacillus sp.* como la disponible comercialmente como Protamex.

En una modalidad, la enzima (por ejemplo, una o más enzimas en la combinación de enzimas) como se describe en la presente se deriva de una bacteria de ácido láctico, preferiblemente uno o más géneros seleccionados del grupo que consiste en: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, and *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella*.

En una modalidad, una o más de la proteasa neutra, la carboxipeptidasa y la aminopeptidasa se derivan de un microorganismo del género *Aspergillus*, preferiblemente de *Aspergillus oryzae*. En una modalidad preferida, la proteasa neutra, la carboxipeptidasa y la aminopeptidasa se derivan de un microorganismo del género *Aspergillus*, preferiblemente de *Aspergillus oryzae*.

Las proteasas utilizadas en la invención pueden ser una mezcla de enzimas (por ejemplo, una mezcla comercial que se obtiene de Sumizyme que comprende enzimas de *Aspergillus oryzae*), o las proteasas pueden derivarse de fuentes separadas (por ejemplo, de diferentes microorganismos o cepas de ellos). Por ejemplo, una proteasa neutra se puede derivar del género *Bacillus*, la carboxipeptidasa del género de *Aspergillus*, y la aminopeptidasa del género *Lactobacillus*.

En una modalidad, la enzima (por ejemplo, una o más enzimas en la combinación de enzimas) como se describe en la presente, no se deriva de una planta (por ejemplo, bromelina, papaína).

En una modalidad preferida, la cantidad de proteasa neutra utilizada en la hidrólisis enzimática, preferiblemente en el paso b) del método como se describe en la presente, se define por una actividad enzimática de 0.2 - 25000 U/g, preferiblemente 2 - 2500 U/g, más preferiblemente 20 - 250 U/g, en donde el peso en g es el peso total del material que contiene colágeno y la formulación líquida.

En una modalidad preferida, la cantidad de carboxipeptidasa utilizada en la hidrólisis

enzimática, preferiblemente en el paso b) del método como se describe en la presente, se define por una actividad enzimática de 0.001 - 500 U/g, preferiblemente 0.01 - 50 U/g, más preferiblemente 0.1 - 5 U/g, en donde el peso en g es el peso total del material que contiene colágeno y la formulación líquida.

5 En una modalidad preferida, la cantidad de aminopeptidasa utilizada en la hidrólisis enzimática, preferiblemente en el paso b) del método como se describe en la presente, se define por una actividad enzimática de 0.002 - 500 U/g, preferiblemente 0.02 - 50 U/g, más preferiblemente 0.2 - 5 U/g, en donde el peso en g es el peso total del material que contiene colágeno y la formulación líquida.

10 El tiempo durante el cual el material que contiene colágeno se somete (por ejemplo, en el paso b del método) a una enzima como se describe en la presente, preferiblemente una o más de la combinación de enzimas como se describe en la presente, puede ser por lo menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 300, o 360 min. Además o como alternativa, el tiempo en que el material que contiene colágeno se
15 somete (por ejemplo, en el paso b del método) a una enzima como se describe en la presente, preferiblemente una o más de la combinación de enzimas como se describe en la presente, puede no ser más de 360, 300, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, o 10 min.

En una modalidad preferida, el material que contiene colágeno se somete (por
20 ejemplo, en el paso b del método) a una enzima como se describe en la presente, preferiblemente una o más de la combinación de enzimas como se describe en la presente, durante 60 a 180 min.

La temperatura a la que se somete el material que contiene colágeno (por ejemplo, en el paso b del método) a una enzima como se describe en la presente, preferiblemente una o más de la combinación de enzimas como se describe en la presente, puede ser por lo menos 15 °C, 20 °C,
25 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, o 80 °C. Además o como alternativa, la temperatura a la que se somete el material que contiene colágeno (por ejemplo, en el paso b del método) a una enzima como se describe en la presente, preferiblemente una o más de la combinación de enzimas como se describe en la presente, puede no ser mayor que 80 °C, 75 °C, 70 °C, 65 °C, 60 °C, 55 °C, 50 °C, 45 °C, 40 °C, 35 °C, 30 °C, 25 °C, 20 °C, o 15 °C.

30 La "temperatura" como se utiliza en la presente significa preferiblemente la temperatura de una formulación líquida en donde está comprendido un material que contiene colágeno, preferiblemente en donde se disuelve un material que contiene colágeno.

En una modalidad preferida, el material que contiene colágeno se somete (por
ejemplo, en el paso b del método) a una enzima como se describe en la presente, preferiblemente
35 una o más de la combinación de enzimas como se describe en la presente, a una temperatura de 30

– 60 °C.

El uso del término “combinación de enzimas” como se describe en la presente no excluye que el material que contiene colágeno se someta a enzimas (parte de la combinación de enzimas) en una forma secuencial. Esto significa que el material que contiene colágeno no necesariamente se somete a todas las enzimas de la combinación de enzimas al mismo tiempo. En una modalidad, la hidrólisis enzimática como se describe en la presente (por ejemplo, en el paso b del método) comprende dos o más pasos de hidrólisis secuenciales, en los que el material que contiene colágeno se somete preferiblemente a diferentes enzimas y/o diferentes mezclas de enzimas.

En una modalidad preferida, el material que contiene colágeno se somete sucesivamente a dos enzimas en la combinación de enzimas, preferiblemente sucesivamente a dos seleccionadas de la proteasa neutra, la carboxipeptidasa y la aminopeptidasa.

En una modalidad, la hidrólisis enzimática, preferiblemente en el paso b del método como se describe en la presente, implica dos o más pasos de hidrólisis, preferiblemente dos pasos, en donde:

- el material que contiene colágeno se somete a la proteasa neutra en un paso y a la carboxipeptidasa y/o la aminopeptidasa en otro paso;
- el material que contiene colágeno se somete a la carboxipeptidasa en un paso y a la proteasa neutra y/o a la aminopeptidasa en otro paso.
- el material que contiene colágeno se somete a la aminopeptidasa en un paso y a la proteasa neutra y/o a la carboxipeptidasa en otro paso.

En una modalidad, la hidrólisis enzimática como se describe en la presente comprende tres pasos de hidrólisis, en donde el material que contiene colágeno se somete preferiblemente a la proteasa neutra, la carboxipeptidasa, y la aminopeptidasa independientemente en cada uno de los tres pasos de hidrólisis.

En una modalidad preferida, el material que contiene colágeno se somete a todas las enzimas (de la combinación de enzimas descritas en la presente) al mismo tiempo.

En una modalidad preferida, el material que contiene colágeno se somete a una mezcla que comprende dos o más de la proteasa neutra, la carboxipeptidasa y la aminopeptidasa, que comprende preferiblemente las tres de la proteasa neutra, la carboxipeptidasa y la aminopeptidasa, en donde el material que contiene colágeno se somete más preferiblemente a la mezcla durante 60 – 180 min, a 30 – 60 °C y a un pH de 5 – 8.

Si hay dos o más pasos de hidrólisis, el “tiempo” en el que el colágeno hidrolizado se somete a una enzima significa preferiblemente el tiempo total. Por ejemplo, si el colágeno hidrolizado se somete a una enzima A durante 60 min en un primer paso de hidrólisis, y se somete a una enzima A durante 60 min en un segundo paso de hidrólisis, entonces se considera que el colágeno hidrolizado

se somete a la enzima A durante 120 min.

Producto que se obtiene por medio de hidrólisis enzimática.

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a un colágeno hidrolizado que se obtiene por medio del método como se describe en la presente.

En la presente descripción, el "colágeno hidrolizado" significa preferiblemente el colágeno hidrolizado que se obtiene por el método como se describe en la presente.

10 En una modalidad preferida, el colágeno hidrolizado descrito en la presente, por ejemplo, tal como se obtiene mediante el método que se enseña en la presente, se deriva de un material que contiene colágeno derivado de uno o más tejidos seleccionados del grupo que consiste en piel, escamas, cartílagos, huesos, tendones, ligamentos y tejido conectivo.

15 En una modalidad preferida, el colágeno hidrolizado como se describe en la presente, por ejemplo, como se obtiene por el método como se enseña en la presente, se deriva de un material que contiene colágeno en donde el colágeno es uno o más tipos seleccionados del grupo que consiste en colágeno porcino, colágeno bovino y colágeno de pescado.

En una modalidad preferida, el colágeno hidrolizado como se describe en la presente, por ejemplo, tal como se obtiene mediante el método que se enseña en la presente, se deriva de un material que contiene colágeno, en donde el material que contiene colágeno es gelatina.

20 El colágeno hidrolizado como se describe en la presente, por ejemplo, como se obtiene por el método como se enseña en la presente, tiene preferiblemente un peso molecular (promedio en peso) de 1000-7000 Da. Este peso molecular parece jugar un papel en el alto efecto reductor de glucosa del colágeno hidrolizado de la invención.

25 El colágeno hidrolizado, por ejemplo, tal como se obtiene mediante el método que se enseña en la presente, puede tener un peso molecular (promedio en peso) de por lo menos 1000 Da (por ejemplo, por lo menos 1200 Da, 1400 Da, 1600 Da, o 1800 Da), o por lo menos 1500 Da, o por lo menos 2000 Da, o por lo menos 2500 Da, o por lo menos 3000 Da, o por lo menos 3500 Da, o por lo menos 4000 Da, o por lo menos 4500 Da, o por lo menos 5000 Da, o por lo menos 6000 Da, o por lo menos 6500 Da, o por lo menos 7000 Da. Además o como alternativa, el colágeno hidrolizado, por ejemplo, tal como se obtiene mediante el método que se enseña en la presente, puede tener un peso
30 molecular (promedio en peso) de no más de 7000 Da, o no más de 6500 Da, o no más de 6000 Da, o no más de 5500 Da, o no más de 5000 Da, o no más de 4500 Da, o no más de 4000 Da, o no más de 3500 Da, o no más de 3000 Da, o no más de 2500 Da, o no más de 2000 Da, o no más de 1500 Da, o no más de 1000 Da.

35 El peso molecular promedio como se describe en la presente, es preferiblemente el peso molecular promedio en peso.

Parece que el peso molecular juega un papel en la capacidad del colágeno hidrolizado de la invención para estimular la secreción de GLP-1 y/o reducir la glucosa en sangre.

En una modalidad, el colágeno hidrolizado tiene un peso molecular promedio en peso de 1500-4500 Da, preferiblemente 2000-4000 Da, más preferiblemente 2500-3500 Da, incluso más
5 preferiblemente 2750-3250 Da.

En una modalidad, el colágeno hidrolizado tiene un peso molecular promedio en número (M_n) de 500-3500 Da, preferiblemente 1000-3000 Da, más preferiblemente 1500-2500 Da, incluso más preferiblemente 1750-2250 Da.

En una modalidad, el colágeno hidrolizado tiene un peso molecular promedio en peso de 2000-4000 Da, preferiblemente 2500-3500 Da, y un peso molecular promedio en número de 1000-
10 3000 Da, preferiblemente 1500-2500 Da.

Además o como alternativa, parece que la distribución del peso molecular juega un papel en la capacidad del colágeno hidrolizado de la invención para estimular la secreción de GLP-1 y/o reducir la glucosa en sangre. En comparación con otros colágenos hidrolizados, por ejemplo, que
15 no se obtienen mediante hidrólisis enzimática con una combinación de enzimas que comprende dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa, el colágeno hidrolizado de la invención en particular puede tener:

- una fracción relativamente alta de péptidos de colágeno que se encuentren en la escala de 2000-5000 Da (por ejemplo, por lo menos el 35 %, o por lo menos el 40 %, o incluso por lo
20 menos el 45 %); y/o

- una fracción relativamente baja de péptidos de colágeno que se encuentren en la escala de menos de 1000 Da (por ejemplo, no más del 15 %, o no más del 12 %, o incluso no más del 10 %); y/o

- una fracción relativamente baja de péptidos de colágeno que se encuentren en la escala de más de 10000 Da (por ejemplo, no más del 5 %, o no más del 2 %, o incluso no más del 1
25 %).

En una modalidad preferida, el colágeno hidrolizado comprende 1-20%, preferiblemente 2-12% en peso de los péptidos de colágeno con un peso molecular por debajo de 1000 Da, calculado en el peso total de los péptidos de colágeno en el colágeno hidrolizado.

En una modalidad preferida, el colágeno hidrolizado comprende 20-40%, preferiblemente 25-35% en peso de los péptidos de colágeno con un peso molecular en la escala de 1000-2000 Da, calculado en el peso total de los péptidos de colágeno en el colágeno hidrolizado.
30

Preferiblemente, el colágeno hidrolizado comprende menos del 35 %, más preferiblemente menos del 32.5 %, incluso más preferiblemente menos del 30% en peso de los
35 péptidos de colágeno con un peso molecular en la escala de 1000-2000 Da, calculado en el peso total

de los péptidos de colágeno en el colágeno hidrolizado.

En una modalidad preferida, el colágeno hidrolizado comprende 35-60%, preferiblemente 40-55% en peso de los péptidos de colágeno con un peso molecular en la escala de 2000-5000 Da, calculado en el peso total de los péptidos de colágeno en el colágeno hidrolizado.

5 Preferiblemente, el colágeno hidrolizado comprende más del 40%, más preferiblemente más del 42.5%, incluso más preferiblemente más del 45% en peso de los péptidos de colágeno con un peso molecular en la escala de 2000-5000 Da, calculado en el peso total de los péptidos de colágeno en el colágeno hidrolizado.

10 En una modalidad preferida, el colágeno hidrolizado comprende 5-25%, preferiblemente 10-20% en peso de los péptidos de colágeno con un peso molecular en la escala de 5000-10000 Da, calculado en el peso total de los péptidos de colágeno en el colágeno hidrolizado.

15 En una modalidad preferida, el colágeno hidrolizado comprende 0 -10%, preferiblemente 0.1-5%, más preferiblemente 0.2-2% en peso de los péptidos de colágeno con un peso molecular por arriba de 10000 Da, calculado en el peso total de los péptidos de colágeno en el colágeno hidrolizado.

Una forma preferida de medir el peso molecular y la distribución del peso molecular del colágeno hidrolizado es mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC). El siguiente protocolo es un protocolo preferido de HPSEC:

20 Se utiliza el HPLC Agilent, serie 1260 Infinity (G1316A, G1329B, G1311C, G1315D) con una precolumna TSKgel SWXL y una columna G2000SWXL (Tosoh Bioscience). El análisis se realiza con el software WinGPC (PSS). El eluyente es regulador de pH de fosfato 100 mM pH 5.3. Las muestras se eluyen de la columna (por ejemplo, 0.5 ml/min, isocrática) y se controlan con detección de UV (por ejemplo, 214 nm, tiempo de análisis: 40 min por inyección + 180 min de equilibrio). La calibración se realiza con el estándar de calibración estrecho (Low FILK).

25 El colágeno hidrolizado, por ejemplo, como se obtiene por el método como se enseña en la presente, preferiblemente tiene una polidispersidad de 1.2-1.8, más preferiblemente 1.3-1.7, incluso más preferiblemente 1.4-1.6. Esta polidispersidad parece jugar un papel en el alto efecto reductor de glucosa del colágeno hidrolizado de la invención.

30 La polidispersidad del colágeno hidrolizado puede ser no mayor que 1.85, o no mayor que 1.75, o no mayor que 1.70, o no mayor que 1.65, o no mayor que 1.60, o no mayor que 1.55. Además o como alternativa, la polidispersidad del colágeno hidrolizado puede ser por lo menos 1.20, o por lo menos 1.25, o por lo menos 1.30, o por lo menos 1.35, o por lo menos 1.40, o por lo menos 1.45, o por lo menos 1.50, o por lo menos 1.55.

35 La "polidispersidad" como se utiliza en la presente significa M_w/M_n , en donde M_w es el peso molecular promedio en peso (Da) y M_n es el peso molecular promedio en número (Da).

M_w se da por medio de la siguiente ecuación:

$$M_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$$

M_n se da por medio de la siguiente ecuación:

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$$

5 en donde N_i es el número de moléculas con peso M_i

Administración del colágeno hidrolizado

En una modalidad preferida, el colágeno hidrolizado como se describe en la presente se administra oralmente.

10 Para mejorar los niveles de glucosa postprandial, el colágeno hidrolizado como se describe en la presente, se administra preferiblemente durante o alrededor de una comida. En el contexto de la presente invención, el colágeno hidrolizado se administra preferiblemente con no más de 240, 180, 120, 60, 30, o 15 min de diferencia (antes o después) de una comida. En una modalidad preferida, el colágeno hidrolizado como se describe en la presente, se administra no más de 60 minutos
15 después de una comida (antes o después).

En modalidades diferentes, la dosis diaria del colágeno hidrolizado como se describe en la presente es por lo menos 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, o 200, todo en g, en donde la dosis diaria es la cantidad en peso seco total administrada a un sujeto por día. Además o como alternativa, en diferentes
20 modalidades, la dosis diaria del colágeno hidrolizado como se describe en la presente no es mayor que 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, o 1, todo en g, en donde la dosis diaria es la cantidad en peso seco total administrada a un sujeto por día.

En una modalidad preferida, el uso del colágeno hidrolizado como se describe en la presente comprende administrar el colágeno hidrolizado en una cantidad entre 1 g y 200 g, o entre 1 g y 100 g, o entre 2 g y 50 g, o entre 5 g y 25 g, en donde la dosis diaria es la cantidad en peso seco total administrada a un sujeto por día.

En una modalidad preferida, el uso de colágeno hidrolizado como se describe en la presente comprende administrar el colágeno hidrolizado en una dosis diaria en una cantidad de 1 –
30 100 g, preferiblemente 2 – 50 g, más preferiblemente 5 – 25 g, en donde la cantidad es la cantidad en peso seco del colágeno hidrolizado.

En modalidades diferentes, la dosis unitaria del colágeno hidrolizado como se describe en la presente está en una cantidad de por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170,
35 180, 190, o 200, todo en g, en donde la cantidad es la cantidad en peso seco del colágeno hidrolizado.

Además o como alternativa, en diferentes modalidades, la dosis unitaria de colágeno hidrolizado como se describe en la presente está en una cantidad de no más de 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1, todo en g, en donde la cantidad es la cantidad en peso seco del colágeno hidrolizado.

En una modalidad, el colágeno hidrolizado como se describe en la presente se administra en una dosis unitaria en una cantidad entre 0.5 g y 200 g, o entre 1 g y 100 g, o entre 2 g y 50 g, o entre 5 g y 25 g, o entre 5 y 15 g, en donde la cantidad es la cantidad en peso seco del colágeno hidrolizado.

En una modalidad, el uso de colágeno hidrolizado como se describe en la presente comprende administrar el colágeno hidrolizado en una dosis unitaria en una cantidad de 2 – 50 g, preferiblemente 5 – 25 g, más preferiblemente 5 – 15 g, en donde la cantidad es la cantidad en peso seco del colágeno hidrolizado.

La dosis diaria del colágeno hidrolizado se puede administrar como una sola dosis unitaria o como dos, tres, cuatro o más dosis unitarias. Las dos o más dosis unitarias pueden ser iguales o diferentes en cantidad. La dosis diaria de colágeno hidrolizado como se describe en la presente se administra preferiblemente como dos dosis unitarias, más preferiblemente como dos dosis unitarias cada una correspondiendo a 30-70%, preferiblemente 40-60% de la cantidad de dosis diaria.

En una modalidad, las dos o más dosis unitarias como se describen en la presente se administran por lo menos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 horas de diferencia entre sí.

En una modalidad preferida, el régimen de dosificación para el colágeno hidrolizado como se describe en la presente comprende administrar la dosis diaria de colágeno hidrolizado como dos dosis unitarias, en donde:

- cada dosis unitaria está en una cantidad de 5-25 g, preferiblemente 5-15 g, en donde la cantidad es la cantidad en peso seco de colágeno hidrolizado; y/o

- las dos dosis unitarias se administran con por lo menos 6 horas, preferiblemente 8 horas, más preferiblemente 12 horas de diferencia entre sí.

En una modalidad preferida, la dosis diaria de colágeno hidrolizado se administra como dos o más dosis unitarias, en donde:

- cada dosis unitaria está en una cantidad de 5-25 g, preferiblemente 5-15 g, en donde la cantidad es la cantidad en peso seco de colágeno hidrolizado; y/o

- las dos o más dosis unitarias se administran con por lo menos 6 horas, preferiblemente 8 horas, más preferiblemente 12 horas de diferencia entre sí.

En una modalidad preferida, el colágeno hidrolizado como se describe en la presente se administra junto con una comida.

En una modalidad, el régimen de dosificación para el colágeno hidrolizado como se describe en la presente comprende administrar el colágeno hidrolizado por lo menos una vez a la semana.

5 En una modalidad, el régimen de dosificación para el colágeno hidrolizado como se describe en la presente comprende administrar colágeno hidrolizado todos los días o cada dos días.

En una modalidad, el colágeno hidrolizado se administra todos los días o cada dos días.

10 En una modalidad, el régimen de dosificación para el colágeno hidrolizado como se describe en la presente comprende administrar el colágeno hidrolizado por lo menos una vez al día.

En una modalidad, el colágeno hidrolizado se administra por lo menos una vez al día.

En una modalidad, el régimen de dosificación para el colágeno hidrolizado como se describe en la presente comprende administrar colágeno hidrolizado durante por lo menos 2 días consecutivos, preferiblemente durante por lo menos 4 días consecutivos, más preferiblemente durante por lo menos 7 días consecutivos.

15 En una modalidad, el régimen de dosificación para el colágeno hidrolizado como se describe en la presente comprende administrar colágeno hidrolizado durante por lo menos 2 semanas consecutivas, preferiblemente durante por lo menos 4 semanas consecutivas, más preferiblemente durante por lo menos 8 semanas consecutivas.

20 En una modalidad, el régimen de dosificación para el colágeno hidrolizado como se describe en la presente comprende administrar colágeno hidrolizado durante por lo menos una semana, preferiblemente durante por lo menos dos semanas consecutivas, más preferiblemente durante por lo menos cuatro semanas consecutivas.

Formulación del colágeno hidrolizado

25 El colágeno hidrolizado como se describe en la presente se puede proporcionar en una formulación de alimentos, formulación de piensos, formulación de suplementos alimenticios, formulación de suplementos de piensos o formulación farmacéutica, preferiblemente una formulación de suplementos alimenticios.

30 El colágeno hidrolizado como se describe en la presente se puede proporcionar en una forma de dosificación sólida tal como una cápsula, una tableta o un polvo, preferiblemente un polvo.

35 El colágeno hidrolizado que se describe en la presente se puede proporcionar en una formulación como una solución o suspensión bebible, una bebida como cerveza, jarabe, una bebida con sabor artificial, una bebida carbonatada, una mezcla en polvo (soluble en agua), una pasta (soluble en agua), un polvo (soluble en agua), una tableta (soluble en agua), una píldora (soluble en agua), una gragea (soluble en agua), una pastilla (soluble en agua), una bolsita (soluble en agua) o una

cápsula (soluble en agua). Además o como alternativa, el colágeno hidrolizado como se enseña en la presente puede estar presente en un alimento funcional, por ejemplo, un zumo, batido, bebida láctea, yogur, bebida de yogur, postre, barra energética, barra nutricional, barra adelgazante o golosinas como gomitas o gomitas rellenas.

5

Uso de colágeno hidrolizado en un método de tratamiento

En una modalidad, la presente invención se refiere a un método de tratamiento, preferiblemente un método de tratamiento terapéutico, para reducir la glucosa en sangre.

En una modalidad, la presente invención se refiere a un método de tratamiento, preferiblemente un método de tratamiento terapéutico, para mejorar la hiperglucemia.

En una modalidad, la presente invención se refiere a un método de tratamiento, preferiblemente un método de tratamiento terapéutico, para mejorar un factor de riesgo de la hiperglucemia.

El método de tratamiento como se describe en la presente se puede utilizar en sujetos que experimentan nivel alto de azúcar en sangre (por ejemplo, hiperglucemia), en cuyo caso el método de tratamiento puede ser de naturaleza preventiva. El método de tratamiento puede comprender una o más características de las modalidades descritas en la presente para el uso de colágeno hidrolizado en la reducción de la glucosa en sangre y/o mejorar (un factor de riesgo de) la hiperglucemia, incluyendo los tipos de colágeno hidrolizado para el uso descrito en la presente, las formulaciones de colágeno hidrolizado para el uso descrito en la presente, los momentos de administración o ingesta de colágeno hidrolizado para el uso descrito en la presente y las dosis de administración o ingesta de colágeno hidrolizado (por ejemplo, regímenes de dosificación, dosis unitarias, dosis diarias) para el uso descrito en la presente.

25

Uso de colágeno hidrolizado para la fabricación de un medicamento

En una modalidad, la presente invención se refiere al uso de colágeno hidrolizado para la fabricación de un medicamento para reducir la glucosa en sangre, en donde el colágeno hidrolizado se obtiene por medio de hidrólisis enzimática de un material que contiene colágeno con una combinación de enzimas, que comprende preferiblemente dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

En una modalidad, la presente invención se refiere al uso de colágeno hidrolizado para la fabricación de un medicamento para mejorar la hiperglucemia, en donde el colágeno hidrolizado se obtiene por medio de hidrólisis enzimática de un material que contiene colágeno con una combinación de enzimas, que comprende preferiblemente dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

35

En una modalidad, la presente invención se refiere al uso de colágeno hidrolizado para la fabricación de un medicamento para mejorar un factor de riesgo de hiperglucemia, en donde el colágeno hidrolizado se obtiene por hidrólisis enzimática de un material que contiene colágeno con una combinación de enzimas, que comprende preferiblemente dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

El uso de colágeno hidrolizado para la fabricación de un medicamento como se describe en la presente puede comprender una o más características de las modalidades descritas en la presente para el uso de colágeno hidrolizado en la reducción de la glucosa en sangre y/o mejorar (un factor de riesgo de) la hiperglucemia, incluyendo los tipos de colágeno hidrolizado para el uso descrito en la presente, las formulaciones de colágeno hidrolizado para el uso descrito en la presente, los momentos de administración o ingesta de colágeno hidrolizado para el uso descrito en la presente y las dosis de administración o ingesta de colágeno hidrolizado (por ejemplo, regímenes de dosificación, dosis unitarias, dosis diarias, cantidades diarias) para el uso descrito en la presente.

Definiciones generales

- Los términos 'que comprende' o 'comprender' y sus conjugaciones, tal como se utilizan en la presente, se refieren a una situación en la que dichos términos se utilizan en su sentido no limitativo para significar que los elementos que siguen a la palabra están incluidos, pero los elementos que no se mencionan específicamente no están excluidos. También abarca el verbo más limitativo 'consistir esencialmente en' y 'consistir en'.

- La referencia a un elemento por el artículo indefinido 'uno' o 'una' no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido 'uno' o 'una' por lo tanto, generalmente significan "por lo menos uno".

- Los términos 'incrementar' y 'nivel incrementado' y los términos 'disminuir' y 'nivel disminuido' (o 'reducir' y "nivel reducido") se refiere preferiblemente a un cambio de por lo menos el 5%, tal como 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% superior o inferior, respectivamente, al nivel correspondiente en un control o referencia. Además o como alternativa, un nivel en una muestra se puede incrementar o disminuir cuando incrementa o disminuye de manera estadísticamente significativa en comparación con un nivel en un control o referencia, independientemente del tamaño del cambio.

- El término "comida" como se utiliza en la presente se refiere a una ocasión para comer que tiene lugar en un momento determinado e incluye comida preparada. Las comidas se realizan a diario, normalmente varias veces al día. El desayuno, el almuerzo y la cena se consideran las comidas principales. Además o como alternativa, se puede considerar que una comida comprende

una cantidad razonablemente grande de alimentos (es decir, por lo menos 500-1000 kcal por comida).

- Como se utiliza en la presente, los términos "sujeto" o "individuo" se refieren a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, preferiblemente un humano.

- Los términos "administrar" o "administración" como se utilizan en la presente se refieren al acto de proporcionar un agente a un sujeto que lo consume. Un sujeto que consume un cierto agente puede administrárselo a sí mismo. En tal caso, los términos "administrado a" puede interpretarse como "tomado por", "usado por" o "consumido por".

- El término "dosis unitaria" como se utiliza en la presente se refiere a una cantidad o unidad de por ejemplo, un compuesto, sustancia, ingrediente activo o composición que se utilizará de una sola vez. La dosis unitaria por ejemplo puede estar en una forma pre-preparada (por ejemplo, dosificación preempaquetada) lista para administración. La dosis unitaria puede, por ejemplo, (también) identificarse a partir del envase o la etiqueta del producto. La dosis diaria total se puede dividir entre múltiples dosis unitarias.

- El término "ingrediente activo" como se utiliza en la presente significa cualquier sustancia, compuesto o composición que induce una respuesta biológica medible *in vitro* y/o *in vivo*, a diferencia de una sustancia, compuesto o composición que proporciona sólo una función física. La respuesta biológica puede ser una respuesta directa o una indirecta, preferiblemente medida en una célula u órgano.

20 **Cláusulas**

En la presente, las cláusulas son modalidades de la invención. Las características de las cláusulas (modalidades) en la presente, se pueden combinar.

Cláusula 1: Colágeno hidrolizado para utilizarse en la disminución de glucosa en sangre, en donde el colágeno hidrolizado se obtiene por hidrólisis enzimática de un material que contiene colágeno con una combinación de enzimas que comprende dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

Cláusula 2: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con la cláusula 1, en donde la combinación de enzimas comprende una proteasa neutra, una carboxipeptidasa, y una aminopeptidasa.

Cláusula 3: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con la cláusula 1 o 2, para utilizarse en la mejora de la hiperglucemia.

Cláusula 4: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con la cláusula 1 o 2, para utilizarse en la mejora de un factor de riesgo de la hiperglucemia.

Cláusula 5: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con la cláusula 4, en donde el factor de riesgo para la hiperglucemia es uno o más seleccionados del grupo que consiste en

resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, diabetes gestacional, índice de masa corporal elevado, obesidad e hiperglucagonemia.

Cláusula 6: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, para utilizarse en la mejora de la glucosa postprandial.

5 Cláusula 7: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, para utilizarse en uno o más seleccionados del grupo que consiste en:

- incrementar el péptido similar al glucagón-1 en sangre;
- disminuir el glucagón en sangre;
- incrementar la insulina en sangre;
- 10 - incrementar la relación de insulina/glucosa en sangre.

Cláusula 8: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde el colágeno hidrolizado se administra en una dosis diaria en una cantidad de 1 – 100 gramos, preferiblemente 2 - 50 g, más preferiblemente 5 – 25 g, en donde la cantidad es la cantidad en peso seco.

15 Cláusula 9: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde el colágeno hidrolizado se administra oralmente, preferiblemente como un suplemento alimenticio.

Cláusula 10: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde el colágeno hidrolizado se administra con un intervalo no mayor a 60
20 minutos entre una comida.

Cláusula 11: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde el material que contiene colágeno se deriva de uno o más tejidos seleccionados del grupo que consiste en piel, escamas, cartílagos, huesos, tendones, ligamentos y tejido conectivo.

25 Cláusula 12: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde el colágeno es uno más tipos seleccionados del grupo que consiste en colágeno porcino, colágeno bovino y colágeno de pescado.

Cláusula 13: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde el material que contiene colágeno es gelatina.

30 Cláusula 14: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde el colágeno hidrolizado tiene un peso molecular promedio de 1000-7000 Da y/o una polidispersidad de 1.2-1.8.

Cláusula 15: Método para obtener colágeno hidrolizado, que comprende a) proporcionar un material que contiene colágeno en una formulación líquida; y

35 b) someter el material que contiene colágeno a una combinación de enzimas que

comprende dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

Cláusula 16: El método de acuerdo con la cláusula 15, en donde la combinación de enzimas comprende una proteasa neutra, una carboxipeptidasa, y una aminopeptidasa.

5 Cláusula 17: El método de acuerdo con la cláusula 15 o 16, en donde la proteasa neutra es una o más seleccionada del grupo que consiste en serina proteasa, proteasa aspártica, cisteína proteasa y metaloproteasa.

Cláusula 18: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15 a 17, en donde la aminopeptidasa es leucina aminopeptidasa.

10 Cláusula 19: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15 a 18, en donde una o más de la proteasa neutra, la carboxipeptidasa y la aminopeptidasa se derivan de un microorganismo del género *Aspergillus*, preferiblemente de *Aspergillus oryzae*.

Cláusula 20: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15 a 19, en donde el material que contiene colágeno se somete a una cantidad de proteasa neutra definida por una actividad enzimática de 0.2 - 25000 U/g, preferiblemente 2 - 2500 U/g, más preferiblemente 20 - 250 U/g, en donde el peso en g es el peso total del material que contiene colágeno y la formulación líquida.

Cláusula 21: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15 a 20, en donde el material que contiene colágeno se somete a una cantidad de carboxipeptidasa definida por una actividad enzimática de 0.001 - 500 U/g, preferiblemente 0.01 - 50 U/g, más preferiblemente 0.1 - 5 U/g, en donde el peso en g es el peso total del material que contiene colágeno y la formulación líquida.

Cláusula 22: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15 a 21, en donde el material que contiene colágeno se somete a una cantidad de aminopeptidasa definida por una actividad enzimática de 0.002 - 500 U/g, preferiblemente 0.02 - 50 U/g, más preferiblemente 0.2 - 5 U/g, en donde el peso en g es el peso total del material que contiene colágeno y la formulación líquida.

25 Cláusula 23: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15 a 22, en donde el material que contiene colágeno se somete a una o más enzimas en la combinación de enzimas durante 60 a 180 min.

Cláusula 24: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15 a 22, en donde el material que contiene colágeno se somete a una o más enzimas en la combinación de enzimas a 30 a 60 °C.

Cláusula 25: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15 a 24, en donde el material que contiene colágeno se somete a una o más enzimas en la combinación de enzimas a un pH de 5 a 8.

Cláusula 26: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15 a 25, en donde el material que contiene colágeno se somete sucesivamente a dos o más enzimas en la combinación

de enzimas.

Cláusula 27: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15 a 26, en donde el material que contiene colágeno se somete simultáneamente a dos o más enzimas en la combinación de enzimas.

5 Cláusula 28: El método de acuerdo con la cláusula 27, en donde el material que contiene colágeno se somete a una mezcla que comprende la combinación de enzimas.

Cláusula 29: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15 a 28, en donde el material que contiene colágeno se proporciona en una formulación líquida en una cantidad de 20 a 50% en peso, preferiblemente 30 a 40% en peso.

10 Cláusula 30: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15 a 29, en donde el material que contiene colágeno se deriva de uno o más tejidos seleccionados del grupo que consiste en piel, escamas, cartílagos, huesos, tendones, ligamentos y tejido conectivo.

Cláusula 31: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15 a 30, en donde el colágeno es uno más tipos seleccionados del grupo que consiste en colágeno porcino, colágeno bovino y colágeno de pescado.

15 Cláusula 32: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15 a 31, en donde el material que contiene colágeno es gelatina.

Cláusula 33: Colágeno hidrolizado que se obtiene por medio del método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 15 a 32.

20 Cláusula 34: El colágeno hidrolizado de acuerdo con la cláusula 33, en donde el colágeno hidrolizado tiene un peso molecular promedio de 1000-7000 Da y/o una polidispersidad de 1.2-1.8.

Cláusula 35: El colágeno hidrolizado de acuerdo con la cláusula 33 o 34, para utilizarse como se define en cualquiera de las cláusulas 1-14.

25 Cláusula 36: Colágeno hidrolizado para utilizarse en la mejora de la hiperglucemia o un factor de riesgo de hiperglucemia, en donde el colágeno hidrolizado se obtiene por hidrólisis enzimática de un material que contiene colágeno con una combinación de enzimas que comprende dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

30 Cláusula 37: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con la cláusula 36, en donde la combinación de enzimas comprende una proteasa neutra, una carboxipeptidasa, y una aminopeptidasa.

Cláusula 38: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con la cláusula 36 a 37, en donde el factor de riesgo para la hiperglucemia es uno o más seleccionados del grupo que consiste en resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, diabetes gestacional, índice de masa corporal

35

elevado, obesidad e hiperglucagonemia.

Cláusula 39: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 36 a 38, para utilizarse en uno o más seleccionados del grupo que consiste en:

- incrementar el péptido similar al glucagón-1 en sangre;
- disminuir el glucagón en sangre;
- incrementar la insulina en sangre;
- incrementar la relación de insulina/glucosa en sangre.

Cláusula 40: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 36 a 39, en donde el colágeno hidrolizado se administra en una dosis diaria en una cantidad de 1 – 100 gramos, preferiblemente 2 - 50 g, más preferiblemente 5 – 25 g, en donde la cantidad es la cantidad en peso seco.

Cláusula 41: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 36 a 41, en donde el colágeno hidrolizado se administra oralmente, preferiblemente como un suplemento alimenticio.

Cláusula 42: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 36 a 41, en donde el colágeno hidrolizado se administra con un intervalo no mayor a 60 minutos entre una comida.

Cláusula 43: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 36 a 42, en donde el material que contiene colágeno se deriva de uno o más tejidos seleccionados del grupo que consiste en piel, escamas, cartílagos, huesos, tendones, ligamentos y tejido conectivo.

Cláusula 44: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 36 a 43, en donde el colágeno es uno más tipos seleccionados del grupo que consiste en colágeno porcino, colágeno bovino y colágeno de pescado.

Cláusula 45: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 36 a 44, en donde el material que contiene colágeno es gelatina.

Cláusula 46: El colágeno hidrolizado para utilizarse de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 36 a 45, en donde el colágeno hidrolizado tiene un peso molecular promedio de 1000-7000 Da y/o una polidispersidad de 1.2-1.8.

Cláusula 47: Uso de colágeno hidrolizado para la reducción no terapéutica de la glucosa en sangre, en donde el colágeno hidrolizado es como se define en cualquiera de las cláusulas 1 a 11.

Cláusula 48: El uso como se reclama en la cláusula 47, en donde el uso es para mejorar la glucosa postprandial.

Cláusula 49: El uso como se reclama en la cláusula 47 o 48, en donde el colágeno

hidrolizado se administra como se define en cualquiera de las cláusulas 40 a 42.

Cláusula 50: Método para obtener colágeno hidrolizado, que comprende

a) proporcionar un material que contiene colágeno en una formulación líquida; y

b) someter el material que contiene colágeno a una combinación de enzimas, que

5 comprende dos o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

Cláusula 51: El método de acuerdo con la cláusula 50, en donde la combinación de enzimas comprende

una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

10 Cláusula 52: El método de acuerdo con la cláusula 50 o 51, en donde la proteasa neutra es una o más seleccionada del grupo que consiste en serina proteasa, proteasa aspártica, cisteína proteasa y metaloproteasa.

Cláusula 53: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50 a 52, en donde la aminopeptidasa es leucina aminopeptidasa.

15 Cláusula 54: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50 a 53, en donde una o más de la proteasa neutra, la carboxipeptidasa y la aminopeptidasa se derivan de un microorganismo del género *Aspergillus*, preferiblemente de *Aspergillus oryzae*.

Cláusula 55: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50 a 54, en donde el material que contiene colágeno se somete a una cantidad de proteasa neutra definida por una
20 actividad enzimática de 0.2 - 25000 U/g, preferiblemente 2 - 2500 U/g, más preferiblemente 20 - 250 U/g, en donde el peso en g es el peso total del material que contiene colágeno y la formulación líquida.

Cláusula 56: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50 a 55, en donde el material que contiene colágeno se somete a una cantidad de carboxipeptidasa definida por una
25 actividad enzimática de 0.001 - 500 U/g, preferiblemente 0.01 - 50 U/g, más preferiblemente 0.1 - 5 U/g, en donde el peso en g es el peso total del material que contiene colágeno y la formulación líquida.

Cláusula 57: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50 a 56, en donde el material que contiene colágeno se somete a una cantidad de carboxipeptidasa definida por una
actividad enzimática de 0.001 - 500 U/g, preferiblemente 0.01 - 50 U/g, más preferiblemente 0.1 - 5 U/g, en donde el peso en g es el peso total del material que contiene colágeno y la formulación líquida.

30 Cláusula 58: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50 a 57, en donde el material que contiene colágeno se somete a una cantidad de aminopeptidasa definida por una actividad enzimática de 0.002 - 500 U/g, preferiblemente 0.02 - 50 U/g, más preferiblemente 0.2 - 5 U/g, en donde el peso en g es el peso total del material que contiene colágeno y la formulación líquida.

Cláusula 59: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50 a 58, en donde
35 el material que contiene colágeno se somete a una o más enzimas en la combinación de enzimas

durante 60 a 180 min.

Cláusula 60: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50 a 59, en donde el material que contiene colágeno se somete a una o más enzimas en la combinación de enzimas a 30 a 60 °C.

5 Cláusula 61: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50 a 60, en donde el material que contiene colágeno se somete a una o más enzimas en la combinación de enzimas a un pH de 5 a 8.

 Cláusula 62: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50 a 61, en donde el material que contiene colágeno se somete sucesivamente a dos o más enzimas en la combinación
10 de enzimas.

Cláusula 63: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50 a 62, en donde el material que contiene colágeno se somete simultáneamente a dos o más enzimas en la combinación de enzimas.

 Cláusula 64: El método de acuerdo con la cláusula 63, en donde el material que
15 contiene colágeno se somete a una mezcla que comprende la combinación de enzimas. Cláusula 65: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50 a 64, en donde el material que contiene colágeno se proporciona en una formulación líquida en una cantidad de 20 a 50% en peso, preferiblemente 30 a 40% en peso.

 Cláusula 66: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50 a 65, en donde
20 el material que contiene colágeno se deriva de uno o más tejidos seleccionados del grupo que consiste en piel, escamas, cartílagos, huesos, tendones, ligamentos y tejido conectivo.

Cláusula 67: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50 a 66, en donde el material que contiene colágeno se deriva de uno o más tejidos seleccionados del grupo que consiste en piel, escamas, cartílagos, huesos, tendones, ligamentos y tejido conectivo.

25 Cláusula 68: El método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 50 a 67, en donde el material que contiene colágeno es gelatina.

Cláusula 69: Colágeno hidrolizado que se obtiene por medio del método de cualquiera de las cláusulas 50 a 68,

en donde el colágeno hidrolizado:

30 - tiene un peso molecular promedio en peso de 2000-4000 Da, preferiblemente 2500-3500 Da; y

- comprende 35-60% en peso de péptidos de colágeno con un peso molecular en la escala de 2000-5000 Da, calculado sobre el peso total de péptidos de colágeno en el colágeno hidrolizado.

35 Cláusula 70: El colágeno hidrolizado de acuerdo con la cláusula 69, en donde el

colágeno hidrolizado comprende más del 40% en peso de los péptidos de colágeno con un peso molecular en la escala de 2000-5000 Da, calculado en el peso total de los péptidos de colágeno en el colágeno hidrolizado.

5 Cláusula 71: El colágeno hidrolizado de acuerdo con la cláusula 69 o 70, en donde el colágeno hidrolizado comprende:

- 1-20% en peso de los péptidos de colágeno con un peso molecular por debajo de 1000 Da; y/o

- 20-40% en peso de los péptidos de colágeno con un peso molecular de 1000-2000 Da; y/o

10 - 5-25% en peso de los péptidos de colágeno con un peso molecular de 5000-10000 Da; y/o

- 0-10% en peso de los péptidos de colágeno con un peso molecular mayor que 10000 Da, calculado en el peso total de los péptidos de colágeno en el colágeno hidrolizado.

15 Cláusula 72: El colágeno hidrolizado de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 69 a 71, en donde el colágeno hidrolizado tiene una polidispersidad de 1.2 a 1.8.

Cláusula 73: El colágeno hidrolizado de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 69 a 72, en donde el colágeno hidrolizado es capaz de estimular la secreción del péptido similar al glucagón-1.

20 Cláusula 74: El colágeno hidrolizado de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 69 a 73, para utilizarse en la mejora de hiperglucemia o un factor de riesgo de hiperglucemia como se define en cualquiera de las cláusulas 36 a 46.

Cláusula 75: Uso de colágeno hidrolizado como se reclama en cualquiera de las cláusulas 69 a 73 en la reducción no terapéutica de la glucosa en sangre como se define en cualquiera de las cláusulas 47 a 49.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 **La figura 1.** Secreción de GLP-1 por células STC-1 tras la incubación con 10 mg/ml de diferentes fracciones de colágeno hidrolizado, obtenidas mediante diferentes tratamientos enzimáticos. Los sobrenadantes se recolectaron después de 2 h de incubación. Los niveles de GLP-1 se determinaron por medio de inmunoensayo enzimático. Los resultados se expresan en media ($n=3$) $\pm$ desviación estándar. "H080" denota el colágeno hidrolizado de la invención.

35 **La figura 2.** Área bajo la curva (AUC) de los niveles de glucosa en sangre en ratones después de la carga de glucosa en el momento 0 y la ingesta del ingrediente/vehículo activo en el momento -45 min. "H080" denota el colágeno hidrolizado de la invención.

La figura 3. Relación de los niveles de insulina/glucosa en sangre en ratones en el momento 15 min, después de la carga de glucosa en el momento 0 y la ingesta del producto/fármaco/vehículo en el momento -45 min. "H080" denota el colágeno hidrolizado de la invención.

5 **La figura 4.** Niveles de GLP-1 en plasma en ratones después de 15 y 30 minutos después de la ingesta de colágeno hidrolizado H080, en comparación con el valor inicial. "H080" denota el colágeno hidrolizado de la invención.

La figura 5. Niveles de GIP en plasma en ratones a los 15 y 30 minutos después de la ingesta de colágeno hidrolizado H080, en comparación con el valor inicial. "H080" denota el colágeno
10 hidrolizado de la invención.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

EJEMPLO 1

15 El Ejemplo 1 muestra el efecto de un hidrolizado de gelatina obtenido por hidrólisis enzimática con una combinación de enzimas elegidas entre una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa sobre el incremento de GLP-1 *in vitro* y la reducción de la glucosa en sangre *in vivo*.

20 Diseño del estudio
Se utilizaron catorce enzimas diferentes (mezclas) en la hidrólisis de gelatina en formulaciones de colágeno hidrolizado. Las formulaciones de colágeno hidrolizado obtenidas de este modo, se sometieron a digestión gastrointestinal simulada (SGID) para obtener fracciones de colágeno
25 hidrolizado bioactivo como se esperaría después de la ingestión y digestión in vivo (Song et al. Food Funct. 2020 Jun 24;11(6):5553-5564).

 Las fracciones de colágeno hidrolizado se examinaron in vitro para determinar su capacidad para mejorar la secreción de GLP-1 por medio de las células STC-1. Las células STC-1 son células tumorales de secretina intestinal y se informa que son un modelo celular predictivo para
30 estudiar los mecanismos de secreción hormonal en el tracto gastrointestinal (Qi et al. Bio Protoc. 2020 Ago 20; 10(16): e3717). GLP-1 actúa como un determinante principal de la homeostasis de la glucosa en sangre, principalmente regulando el vaciamiento gástrico, mejorando la secreción de insulina pancreática y suprimiendo la secreción de glucagón pancreático. La secreción de GLP-1 por medio de las células STC-1 por lo tanto fue el parámetro de resultado preferido para determinar cómo las
35 fracciones de colágeno hidrolizado pueden mejorar los niveles de glucosa en el cuerpo.

 La fracción del colágeno hidrolizado más prometedora identificada in vitro se probó

además para su actividad reductora de glucosa en ratones. La actividad reductora de glucosa se estableció con base en los cambios en el GLP-1 plasmático, GIP, glucosa e insulina. La eficacia de la fracción de colágeno hidrolizado se comparó con la de la medicina reductora de glucosa sitagliptina.

5 Métodos

Hidrólisis enzimática de colágeno

El polvo de gelatina se disolvió en agua desmineralizada mediante calentamiento y agitación para proporcionar una solución de gelatina al 35 % en peso. La temperatura de la solución de la gelatina se ajustó a 40 – 55 °C. El pH de la gelatina se ajustó a pH 5.5 – 8.0. Cuando se alcanzó la temperatura y pH apropiados, las enzimas (mezclas) como se muestran en el Cuadro 1, se agregaron y la hidrólisis se llevó a cabo bajo agitación. Para la condición "H080", se utilizó una mezcla de enzimas disponible comercialmente (Sumizyme FP-G disponible en Takabio, Japón), que comprende una mezcla de una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa, derivada de *Aspergillus oryzae*. La temperatura se mantuvo constante. Después de 120 min, la hidrólisis enzimática se terminó por inactivación de calor de las enzimas. Posteriormente, la solución se enfrió a 55 °C. La solución de la gelatina hidrolizada se sometió a purificación, filtración y esterilización. Un polvo de gelatina hidrolizada final se obtuvo por medio de secado por aspersión.

20

CUADRO 1

Resumen de las enzimas (mezclas) utilizadas para la hidrólisis del colágeno

Nombre del grupo	Actividad de la(s) enzima(s)			Sitio de escisión
	Enzima 1	Enzima 2	Enzima 3	
Blanco	-	-	-	-
CH1	Proteasa neutra (serina proteasa)	-	-	Aminoácidos no terminales
CH2	Proteasa neutra (serina proteasa)	-	-	Aminoácidos no terminales
CH3	Proteasa neutra (serina proteasa)	Proteasa neutra (metaloproteasa)	-	Aminoácidos no terminales
CH4	Proteasa neutra (serina proteasa)	-	-	Aminoácidos no terminales
CH5	Proteasa neutra (Metaloproteasa)	-	-	Aminoácidos no terminales
CH6	Proteasa neutra (Serina proteasa)	-	-	Aminoácidos no terminales
CH7	Proteasa neutra (serina proteasa)	-	-	Aminoácidos no terminales
CH8	Proteasa neutra (cisteína)	-	-	Aminoácidos no terminales

	proteasa)			
CH9	Proteasa neutra (Serina proteasa)	-	-	No terminales Aminoácidos
CH10	Colagenasa	-	-	Aminoácidos terminales + no terminales
H080	Proteasa neutra (50.000 U/g)	Carboxipeptidasa (300-700 U/g)	Leucina aminopeptidasa (500-1200 U/g)	Aminoácidos terminales + no terminales

Secreción de GLP-1 por medio de las células STC-1

Las células STC-1 se incubaron con diferentes concentraciones finales (0.2, 0.5 y 1% de materia seca en regulador de pH de Hepes a pH 7.4) de los diferentes colágenos hidrolizados obtenidos después de la digestión gastrointestinal simulada (SGID). Los sobrenadantes se recolectaron después de 2 h de incubación. Los niveles de GLP-1 se determinaron por medio de inmunoensayo enzimático y se expresaron en pg/ml. Los datos se expresan en media (n=3) $\pm$ desviación estándar.

Las células se estimularon con 2, 5, o 10 mg/ml de enzima (mezcla). Para todas las enzimas (mezclas), se observó un incremento dependiente de la dosis en la secreción de GLP-1, con la secreción más alta de GLP-1 para la condición de 10 mg/ml. Por lo tanto, la figura 1 muestra los resultados para la concentración de 10 mg/ml para la comparación de la enzima (mezclas).

Modelo de ratón in vivo

Se utilizó el siguiente modelo de ratón para determinar el área bajo la curva (AUC) de los niveles de glucosa en sangre, insulina/glucosa en sangre, niveles plasmáticos de GLP-1 y niveles plasmáticos de GIP. Se asignaron al azar ratones C57BL6/J (machos, 23-25 g, 8 semanas de edad) a los grupos de tratamiento (n=10 ratones/grupo) según su peso corporal.

Los ratones ayunaron durante 6 horas, después de lo cual se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT). Los ratones se trataron con vehículo, elemento de prueba H080 en 3 concentraciones diferentes (40 mg/kg, 400 mg/kg y 4 g/kg), y sitagliptina como un control positivo. 45 minutos después de recibir los ingredientes activos, los ratones recibieron una carga de glucosa oral (2 g/kg de peso corporal).

La glucosa en sangre se midió en la sangre recolectada -45, 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la carga de glucosa. La insulina se determinó (mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, ELISA) en plasma recolectado 45 minutos antes (-45 minutos) y 15 minutos después (+15 minutos) de la carga de glucosa. A partir de esto, la relación de insulina/glucosa podría determinarse.

Los niveles de GLP-1 y GIP en plasma se evaluaron una semana después de la prueba de OGTT. Para este propósito, los ratones ayunaron durante 6 horas y fueron tratados con sitagliptina (400 μ g/ratón) para evitar las degradaciones de GLP-1 y GIP por la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-IV).

Después de 30 min, los ratones recibieron vehículo o el elemento de prueba H080 en una cantidad de 4 g/kg de peso corporal. 15 minutos o 30 minutos después de recibir los ingredientes activos, los ratones fueron anestesiados y se les tomó una muestra de sangre de la vena porta. Los niveles de GLP-1 y GIP en plasma se midieron por medio de ELISA.

5 El modelo en ratones sanos demuestra tanto la prevención como el tratamiento de la glucosa en sangre alta (y otros parámetros relacionados con la hiperglucemia) después del tratamiento con ingredientes activos.

10 Siguiendo una metodología similar como se describe para los ratones sanos, también se realizó un estudio en ratones obesos que naturalmente han desarrollado niveles altos de glucosa en sangre con un resultado similar.

Resultados

Secreción de GLP-1 in vitro

15 La figura 1 muestra la secreción de GLP-1 en células STC-1 después de la incubación con 10 mg/ml de colágeno hidrolizado, como se obtuvo por medio de hidrólisis con la enzima (mezclas) proporcionada en el Cuadro 1 en condiciones óptimas de procesamiento.

20 El colágeno hidrolizado denominado H080 indujo la mayor secreción de GLP-1. En comparación con el blanco, H080 indujo un incremento de 5800 veces en la secreción de GLP-1. El incremento de GLP-1 mediado por H080 fue por lo menos 2.5 veces mayor que el mediado por la otra enzima (mezclas) en la prueba comparativa.

Los datos indican que la combinación de una proteasa neutra (por ejemplo, serina proteasa), una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa (por ejemplo, leucina aminopeptidasa) induce con diferencia la secreción más alta de GLP-1 en comparación con otras enzimas y combinaciones de enzimas.

25 Se encontró que la mera combinación de dos o más enzimas (por ejemplo, la combinación de dos proteasas neutras en "CH3") no es suficiente para promover aún más la secreción de GLP-1 en comparación con el uso de una sola enzima (por ejemplo, una proteasa neutra en "CH1" o "CH2", entre otras).

30 Se encontró que la mera combinación de una endoproteasa (es decir, escisión enzimática en aminoácidos no terminales) y una exoproteasa (es decir, la escisión enzimática en los aminoácidos terminales)

35 no es suficiente para promover aún más la secreción de GLP-1 en comparación con el uso de solo una endoproteasa. Por ejemplo, "CH12" comprende tanto actividad endopeptidasa como exopeptidasa, pero no pudieron promover más la secreción de GLP-1 en comparación con las enzimas que comprenden solo actividad endopeptidasa.

Los resultados que se muestran en la figura 1 se reprodujeron con diferentes lotes de gelatina.

Los resultados muestran que la hidrólisis del colágeno con una combinación de dos o más enzimas seleccionadas de una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa es importante para
5 obtener colágeno hidrolizado con fuerte potencia en la reducción de glucosa, tal como se induce por medio de GLP-1.

Actividad reductora de glucosa in vivo

La figura 2 muestra los niveles de glucosa en sangre en ratones después del
10 tratamiento con 40 mg/kg de H080, 400 mg de H080, 4 g/kg de H080, y 400 µg/ratón de sitagliptina. Se observó una disminución dependiente de la dosis en la glucemia después del tratamiento con H080. La dosis más alta de H080 tuvo un efecto reductor de glucosa en sangre similar que el fármaco sitagliptina. Esto muestra que el colágeno hidrolizado se puede proporcionar como una alternativa segura para fármacos que a menudo se asocian con efectos secundarios.

15 La figura 3 muestra los niveles de insulina/glucosa en sangre en ratones después del tratamiento con 40 mg/kg de H080, 400 mg de H080, 4 g/kg de H080, y 400 µg/ratón de sitagliptina. H080 medió un incremento significativo en la relación insulina/glucosa. Se observó un incremento dependiente de la dosis en la relación de insulina/glucosa después del tratamiento con H080.

La figura 4 muestra los niveles de GLP-1 en plasma después del tratamiento de control
20 o después del tratamiento con 4 g/kg de H080. El tratamiento con H080 incrementó los niveles de GLP-1 en plasma, en donde el efecto fue mayor 30 min después de la ingesta de H080.

La figura 5 muestra los niveles de GIP en plasma después del tratamiento de control
o después del tratamiento con 4 g/kg de H080. El tratamiento con H080 disminuyó los niveles de GIP en plasma, en donde el efecto fue mayor 30 minutos después de la ingesta de H080.

25 En el modelo de ratón sano, los ratones recibieron ingredientes activos antes de la carga de glucosa. El ratón sano por lo tanto es particularmente adecuado para estudiar la prevención de hiperglucemia. Un estudio también se realizó en ratones obesos que naturalmente han desarrollado niveles altos de glucosa en sangre. La metodología fue similar a la descrita para los ratones sanos. Dado que los ratones obesos ya tienen un nivel de glucosa en sangre incrementado cuando reciben
30 los ingredientes activos, una mejora en la glucosa en sangre (y otros parámetros relacionados con la hiperglucemia) en el modelo de ratón obeso fortalece aún más el tratamiento de la enfermedad mediante ingredientes activos.

Efectos similares en los parámetros estudiados en las figuras 1 a 5 se observaron en ratones obesos con glucosa alta en sangre. Esto refuerza aún más el tratamiento efectivo de la
35 hiperglucemia (y los parámetros relacionados) por medio de H080.

Combinación de enzimas elegidas de una proteasa neutra, carboxipeptidasa y aminopeptidasa en actividad reductora de glucosa

Los inventores encontraron que la alta actividad reductora de glucosa (por ejemplo, con base en el nivel de secreción de GLP-1) se puede lograr cuando por lo menos dos enzimas se utilizan en la hidrólisis enzimática del material que contiene colágeno, en donde las dos enzimas se eligen de una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa.

Como se ilustra en el Cuadro 2, el uso de una proteasa neutra en hidrólisis enzimática de la gelatina produce un hidrolizado de gelatina que tiene una actividad reductora de glucosa, aunque limitada. Una combinación de una proteasa neutra con carboxipeptidasa sola o una aminopeptidasa sola proporciona una actividad reductora de glucosa más fuerte con relación al blanco o el uso de una proteasa neutra sola. La combinación de las tres enzimas produce un hidrolizado de gelatina con la actividad reductora de glucosa más alta.

15

CUADRO 2

Enzima(s) utilizada(s) para hidrólisis de colágeno y el efecto del hidrolizado en la reducción de glucosa

Grupo	Enzima(s)	Actividad reductora de glucosa
I	Blanco	Muy baja/ausente
II	1. Proteasa neutra (de <i>Aspergillus</i>)	Baja
III	1. Proteasa neutra (de <i>Aspergillus</i>) + 2. Carboxipeptidasa (de <i>Aspergillus</i>)	Alta
IV	1. Proteasa neutra (de <i>Aspergillus</i>) + 2. Aminopeptidasa (de <i>Aspergillus</i>)	Alta
V	1. Proteasa neutra (de <i>Aspergillus</i>) + 2. Carboxipeptidasa (de <i>Aspergillus</i>) + 3. Aminopeptidasa (de <i>Aspergillus</i>)	Muy alta
VI	1. Proteasa neutra (de <i>Bacillus</i>) + 2. Carboxipeptidasa (de <i>Aspergillus</i>) + 3. Aminopeptidasa (de <i>Lactobacillus</i>)	Muy alta

Caracterización del colágeno hidrolizado con alta actividad reductora de glucosa

20

El colágeno hidrolizado con alta actividad reductora de glucosa (por ejemplo, grupo III-IV en el Cuadro 2) se caracterizó por un peso molecular promedio en peso de 1000-7000 Da y una polidispersidad (peso molecular promedio en peso/peso molecular promedio en número) de 1.2 – 1.8 (el promedio de ~1.56 se midió para >100 mediciones), como se determinó por medio de HPSEC.

25

EJEMPLO 2

El Ejemplo 2 muestra la influencia de las condiciones del proceso al obtener el colágeno

hidrolizado para reducir la glucosa en sangre.

Métodos

El hidrolizado de gelatina se produjo por medio de hidrólisis utilizando una combinación de una proteasa neutra (50.000 U/g), una aminopeptidasa (500-1200 U/g) y una carboxipeptidasa (300-700 U/g) como se describe en el Ejemplo 1.

Se probó una amplia gama de condiciones de trabajo, que abarcan las condiciones que se utilizan normalmente en la hidrólisis enzimática.

La concentración de gelatina en la solución de partida varió entre 10-50% en peso. Las enzimas se utilizaron en una concentración de 2000 ppm para la hidrólisis. El pH durante la hidrólisis enzimática varió entre pH 4.0 - 10.0. La temperatura durante la hidrólisis enzimática varió entre 20 - 70°C.

El Cuadro 3 muestra la influencia de la concentración de gelatina, el pH, y la temperatura de la hidrólisis enzimática en la obtención de fracciones del hidrolizado de gelatina para reducir la glucosa en sangre en una prueba preliminar. La secreción de GLP-1 se probó utilizando la misma metodología como en el Ejemplo 1.

El Cuadro 4 muestra la influencia de la concentración de gelatina, el pH, y la temperatura de la hidrólisis enzimática en la obtención de fracciones del hidrolizado de gelatina para reducir la glucosa en sangre con base en pruebas más elaboradas y extensas. La secreción de GLP-1 se probó utilizando la misma metodología como en el Ejemplo 1.

CUADRO 3

Influencia de la concentración de gelatina, el pH, y la temperatura de la hidrólisis enzimática en la obtención de fracciones del hidrolizado de gelatina para reducir la glucosa en sangre en una prueba preliminar

Condición del proceso		adecuada como ingrediente activo para reducir la glucosa en sangre
Gelatina % en peso	10%	No
	20%	Sí
	30%	Sí
	40%	Sí
	50%	No
pH	pH 4	No
	pH 5	Sí
	pH 6	Sí
	pH 8	Sí
	pH 10	No

Temperatura	20 °C	No
	30 °C	Sí
	40 °C	Sí
	50 °C	Sí
	60 °C	Sí
	70 °C	No

CUADRO 4

Influencia de la concentración de gelatina, el pH, y la temperatura de la hidrólisis enzimática en la obtención de fracciones del hidrolizado de gelatina para reducir la glucosa en sangre con base en pruebas más elaboradas y extensas. +: menos adecuado; ++: más adecuado; +++: lo más adecuado

Condición del proceso		adecuada como ingrediente activo para reducir la glucosa en sangre
Gelatina % en peso	10%	++
	20%	+++
	30%	+++
	35%	+++
	40%	++
	45%	+
	50%	+
pH	pH 4.0	+
	pH 4.5	+
	pH 5.0	++
	pH 5.5	+++
	pH 6.0	+++
	pH 6.5	+++
	pH 7.0	++
	pH 7.5	++
	pH 8.0	+
	pH 9.0	+
	pH 10.0	+
Temperatura	20 °C	+
	30 °C	+
	35 °C	+
	40 °C	+
	45 °C	+++
	50 °C	+++
	55 °C	++
	60 °C	+

Como se muestra en los Cuadro 3 y 4 colectivamente, se encontró que un colágeno hidrolizado adecuado para mejorar la secreción de GLP-1 se puede lograr en una amplia escala de valores para la concentración del precursor (gelatina % en peso), pH y temperatura.

En cuanto a la concentración del precursor (gelatina % en peso), se obtuvieron resultados satisfactorios en toda la escala de 10-50 % en peso probado, con un resultado aparentemente óptimo a una concentración de 20-35% en peso.

En cuanto al pH, se obtuvieron resultados satisfactorios en toda la escala de pH 4.0-10.0 probado, con un nivel aparentemente óptimo en pH 5.5-6.5.

En cuanto a la temperatura, se obtuvieron resultados satisfactorios en toda la escala de 20-60 °C probada, con un nivel aparentemente óptimo a 45-50 °C.

Los resultados muestran que la hidrólisis realizada a temperaturas (excesivamente) altas (por ejemplo, a una temperatura de 70 °C o superior) puede no dar lugar a un producto de colágeno hidrolizado adecuado para mejorar la secreción de colágeno GLP-1. Se considera que esto es el resultado de la desnaturalización de la enzima y por consiguiente, una velocidad de reacción alterada.

La combinación de una concentración preferida de gelatina, pH, y temperatura puede producir una mejor actividad para mejorar la secreción de GLP-1 por medio de las células STC-1. Como se muestra en el Cuadro 5, la combinación de la concentración de gelatina de (30-40 % en peso), pH (6 – 7.5), y la temperatura (40-55°C) produce una actividad sorprendentemente alta del hidrolizado de gelatina en la mejora de la secreción de GLP-1 por medio de las células STC-1. La secreción de GLP-1 se probó utilizando la misma metodología como en el Ejemplo 1.

20

CUADRO 5

Secreción de GLP-1 por medio de las células STC-1 estimuladas con colágeno hidrolizado obtenido mediante una combinación de una proteasa neutra, una carboxipeptidasa y una aminopeptidasa, en la que la hidrólisis enzimática se realizó en diferentes condiciones del proceso

Condiciones del proceso	Nivel de GLP-1
30-40% en peso de gelatina, pH 6-7.5, 40-55°C	3471 pg/ml
30-40% en peso de gelatina, pH 7.5-8.5, 55-65°C	346 pg/ml

25

EJEMPLO 3

El Ejemplo 3 muestra el peso molecular y la distribución del peso molecular del colágeno hidrolizado obtenido por hidrólisis con diferentes enzimas (mezclas), en relación con la capacidad de los colágenos hidrolizados para estimular la secreción de GLP-1 por medio de las células STC-1.

El Cuadro 6 muestra el peso molecular y la distribución del peso molecular de las

formulaciones del colágeno hidrolizado obtenidas con diferentes enzimas, con sus diferentes capacidades para estimular la secreción de GLP-1 en las células STC-1. La metodología utilizada para la hidrólisis y para evaluar la secreción de GLP-1 fue la misma que la descrita en el Ejemplo 1.

5 "H080" se produjo por medio de hidrólisis utilizando una combinación de una proteasa neutra (50.000 U/g), una aminopeptidasa (500-1200 U/g) y una carboxipeptidasa (300-700 U/g) como se describe en el Ejemplo 1. Los hidrolizados de colágeno "CH11-CH19" se obtuvieron por hidrólisis con una proteasa neutra, alcalina o ácida.

Se consideró una secreción de GLP-1 "promedio" si la secreción de GLP-1 era por lo menos 1000 veces mayor en comparación con la estimulación con un control en blanco.

10 Como se observa en el Cuadro 6, "H080" indujo una secreción de GLP-1 ~ 6000 veces mayor en comparación con la estimulación con un control en blanco y se considera una secreción de GLP-1 "muy alta". Los colágenos hidrolizados de acuerdo con los grupos "CH11-CH19", es decir, obtenidos por hidrólisis con una proteasa neutra, alcalina o ácida, no muestran secreción de GLP-1, la secretan en cantidades pequeñas o solo en cantidades promedio.

15 Como se observa en el Cuadro 6, "H080" se caracteriza por un peso molecular promedio en peso de ~3000 Da (o un peso molecular promedio medio de ~2000 Da). "H080" se caracteriza además por una fracción alta de péptidos de colágeno (es decir, ~47.2%) en la escala de 2 a 5 kDa. "H080" se caracteriza además por la alta actividad estimuladora en la secreción de GLP-1 (es decir, incremento de ~6000 veces en comparación con el grupo de control en blanco). Los grupos
20 "CH11-CH19" carecen de una o más de estas características.

CUADRO 6

25 **Resumen de las enzimas (mezclas) utilizadas para la hidrólisis del colágeno, peso molecular y distribución del peso molecular del colágeno hidrolizado obtenido y su capacidad para estimular la secreción de GLP-1 en células STC-1**

Nombre del grupo	Secreción de GLP-1 Con relación al blanco	Mn (Da)	Mw (Da)	Pd	Distribución del peso molecular (%)				
					<1 kDa	1-2 kDa	2-5 kDa	5-10 kDa	>10 kDa
CH11 Proteasa neutra (serina proteasa)	No/baja	1391	2007	1.4	18.4	46.8	30.3	4.2	0.3
CH12 Proteasa neutra (serina proteasa)	No/baja	2131	3972	1.9	7.9	24.9	40.2	21.1	5.9
CH13 Proteasa neutra (metaloproteasa)	No/baja	3842	7764	2.0	3	8.8	26.9	33.9	27.5
CH14	Promedio	1664	2602	1.6	13.3	36	40	9.8	0.9

Proteasa alcalina (metalo proteasa)									
CH15 Proteasa alcalina (serina proteasa)	No/baja	2652	6078	2.3	5.5	14.9	36.3	25.3	18
CH16 Proteasa alcalina (serina-/metalo proteasa)	No/baja	3289	6681	2.0	2.9	12	31.7	30.8	21.7
CH17 Proteasa alcalina (colagenasa)	No/baja	1119	1484	1.3	27	55.8	16.8	0.4	0.1
CH18 Proteasa alcalina (serina proteasa)	Promedio	1425	2055	1.4	17.5	47.8	30.5	3	1.2
CH19 Proteasa ácida (cisteína proteasa)	No/baja	1333	1852	1.4	20.5	47.2	30	2.4	0
H080 Proteasa neutra + Carboxipeptidasa + Leucina aminopeptidasa	Muy alta	1933	3063	1.6	8.7	28.8	47.2	14.4	0.9