

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
24. Mai 2012 (24.05.2012)



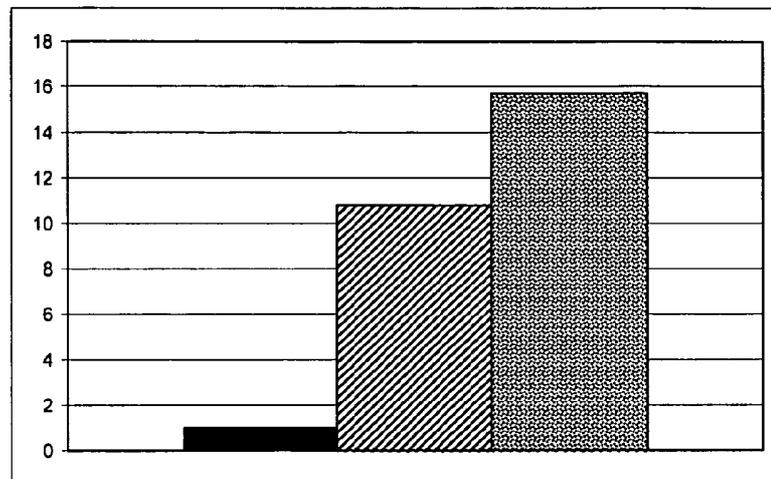
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/065782 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation:
A61Q 19/08 (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/067028
- (22) Internationales Anmeldedatum:
29. September 2011 (29.09.2011)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2010 060 564.6
15. November 2010 (15.11.2010) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **GELITA AG** [DE/DE]; Uferstraße 7, 69412 Eberbach (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HAUSMANN, Stephan** [DE/DE]; Friedrichstraße 50, 68199 Mannheim (DE). **GIESEN-WIESE, Monika** [DE/DE]; In den Schafhecken 14, 64739 Höchst (DE). **OESSER, Steffen** [DE/DE]; Deichweg 17, 24960 Glücksburg (DE).
- (74) Anwalt: **HOEGER, STELLRECHT & PARTNER**; Uhlandstrasse 14c, 70182 Stuttgart (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

- (54) Title: COLLAGEN HYDROLYSATE USED TO IMPROVE THE HEALTH OF HUMAN SKIN, HAIR AND/OR NAILS
- (54) Bezeichnung : KOLLAGENHYDROLYSAT FÜR DIE VERWENDUNG ZUR VERBESSERUNG DER GESUNDHEIT DER MENSCHLICHEN HAUT, HAARE UND/ODER NÄGEL

Fig. 1A



(57) Abstract: The invention relates to a collagen hydrolysate used to improve the health of human skin, hair and/or nails. At least 90 wt. % of said collagen hydrolysate has a molecular weight of less than 3500 Da, and the collagen hydrolysate has at least four characteristic peptides with a molecular weight of between 600 and 1200 Da.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2012/065782 A2



Veröffentlicht:

- *ohne internationalen Rechenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)*

Die Erfindung betrifft ein Kollagenhydrolysat für die Verwendung zur Verbesserung der Gesundheit der menschlichen Haut, Haare und/oder Nägel, wobei mindestens 90 Gew.% des Kollagenhydrolysats ein Molekulargewicht von weniger als 3.500 Da aufweisen, und wobei das Kollagenhydrolysat mindestens vier charakteristische Peptide mit einem Molekulargewicht zwischen 600 und 1.200 Da umfasst.

Kollagenhydrolysat für die Verwendung zur Verbesserung der Gesundheit der menschlichen Haut, Haare und/oder Nägel

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Kollagenhydrolysat für die Verwendung zur Verbesserung der Gesundheit der menschlichen Haut, Haare und/oder Nägel.

Es ist seit einiger Zeit bekannt, dass durch die orale Aufnahme von Kollagenhydrolysat vorteilhafte Effekte in Bezug auf die Gesundheit der Haut, aber auch der Haare und/oder Nägel beim Menschen erzielt werden können (siehe z.B. Vivian Zague: "A new view concerning the effects of collagen hydrolysate intake on skin properties" in *Arch. Dermatol. Res.* 2008 (9) 479-483). Unter einer Verbesserung der Gesundheit der Haut wird in diesem Zusammenhang jede positive Beeinflussung der natürlichen Eigenschaften und Funktionen der Haut verstanden, wobei diese Eigenschaften und Funktionen sowohl in Folge der Alterung als auch zusätzlich durch verschiedene negative Umwelteinflüsse beeinträchtigt werden können. Auch auf die Eigenschaften der Haare und/oder Nägel wirkt sich die Aufnahme von Kollagenhydrolysat vorteilhaft aus.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die positiven Effekte von Kollagenhydrolysat auf die Gesundheit von Haut, Haaren und/oder Nägeln weiter zu steigern und ein für diese Verwendung besonders effektives Kollagenhydrolysat vorzuschlagen.

Diese Aufgabe wird bei dem Kollagenhydrolysat der eingangs genannten Art erfindungsgemäß dadurch gelöst, dass mindestens 90 Gew.% des Kollagenhydrolyсата ein Molekulargewicht von weniger als 3.500 Da aufweisen, und dass das Kollagenhydrolysat mindestens vier charakteristische Peptide mit einem Molekulargewicht zwischen 600 und 1.200 Da umfasst.

Kollagenhydrolysate enthalten Peptide mit unterschiedlichen Kettenlängen bzw. Molekulargewichten, die bei der Spaltung der Proteinketten des Kollagens

- 2 -

entstehen, wobei sich die Molekulargewichtsverteilungen dieser Peptide in Abhängigkeit von den Herstellungsbedingungen des Hydrolysats deutlich unterscheiden können. Es hat sich nun überraschenderweise gezeigt, dass sich ein Kollagenhydrolysat mit den vorstehend genannten Eigenschaften in verschiedener Hinsicht besonders vorteilhaft auf die Hautgesundheit auswirkt, d.h. deutlich bessere Ergebnisse zeigt als die bisher eingesetzten Kollagenhydrolysate, die einen wesentlich geringeren Anteil an niedermolekularen Peptiden enthalten und/oder die die charakteristischen Peptide nicht enthalten.

Die Molekulargewichtsverteilung des Kollagenhydrolysats, die dem Grenzwert von mindestens 90 Gew.% unter 3.500 Da zu Grunde liegt, kann z.B. mittels einer Gelpermeationschromatographie unter Verwendung eines Kalibrierungsstandards aus definierten Kollagenfragmenten sehr genau und reproduzierbar bestimmt werden.

Bevorzugt weisen mindestens 45 Gew.% des Kollagenhydrolysats ein Molekulargewicht von weniger als 1.500 Da auf, d.h. ein gewisser Anteil der Peptide des Kollagenhydrolysats ist besonders kurzkettig. Es hat sich gezeigt, dass durch solche besonders niedermolekularen Anteile, die in derzeit verwendeten Kollagenhydrolysaten nur in wesentlich geringerer Menge enthalten sind, sehr ausgeprägte Effekte auf die Hautgesundheit erzielt werden können.

Das mittlere Molekulargewicht (Gewichtsmittel M_w) des erfindungsgemäß verwendeten Kollagenhydrolysats liegt typischerweise im Bereich von ca. 1.700 bis ca. 2.300 Da.

Das Vorhandensein der charakteristischen Peptide des Kollagenhydrolysats, die interessanterweise wesentlich zu dessen Wirksamkeit beitragen, kann insbesondere mittels MALDI-Massenspektroskopie bestimmt werden, wobei die charakteristischen Peptide im Massenspektrum als Peaks auftreten. Bevorzugt weisen die mindestens vier charakteristischen Peptide in einer mittels MALDI-Massenspektroskopie bestimmten Molekulargewichtsverteilung eine mindes-

- 3 -

tens doppelte Intensität, weiter bevorzugt eine mindestens vierfache Intensität im Vergleich zu ihrer Umgebung auf.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst das Kollagenhydrolysat ein Peptid zwischen 620 und 690 Da, ein Peptid zwischen 790 und 860 Da, ein Peptid zwischen 980 und 1.050 Da und ein Peptid zwischen 1.175 und 1.245 Da auf. Diese Peptide unterscheiden das Kollagenhydrolysat gemäß der Erfindung auf charakteristische Weise von bekannten Kollagenhydrolysaten.

Das Kollagenhydrolysat kann zusätzlich auch charakteristische Peptide zwischen 1.500 und 3.500 Da aufweisen, die ebenfalls ein Unterscheidungsmerkmal zu Kollagenhydrolysaten gemäß dem Stand der Technik darstellen.

Bevorzugt weist das Kollagenhydrolysat einen Anteil an Hydroxyprolin von 12 Gew.% oder mehr auf. Die durch post-translationale Hydroxylierung von Prolin gebildete Aminosäure Hydroxyprolin kommt ausschließlich in Kollagen vor, so dass ein hoher Anteil an Hydroxyprolin im Kollagenhydrolysat ein Maß für die weitgehende Abwesenheit von anderen Bindegewebsproteinen (z.B. Elastin und Proteoglykane) darstellt, deren Fragmente in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren in gewissen Mengen ebenfalls in Kollagenhydrolysaten enthalten sein können.

Günstig ist es, wenn das Kollagenhydrolysat durch enzymatische Hydrolyse von Gelatine hergestellt ist. Gelatine umfasst denaturiertes Kollagen und wird mittels verschiedener, dem Fachmann bekannter Verfahren aus dem Bindegewebe oder aus den Knochen verschiedener Tierarten gewonnen. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird die als Ausgangsmaterial für das Kollagenhydrolysat eingesetzte Gelatine vorzugsweise aus der Haut von Säugetieren, insbesondere aus Schweineschwarte oder Rinderspalt, gewonnen, wobei aber auch die Verwendung von Gelatine aus Geflügel nicht ausgeschlossen ist.

- 4 -

Die enzymatische Hydrolyse der Gelatine erfolgt in der Regel durch mindestens eine Endoprotease, wobei es im Rahmen der Erfindung bevorzugt ist, mehrere Endoproteasen (d.h. mindestens zwei verschiedene Endoproteasen) einzusetzen, um dadurch das Aminosäureprofil des resultierenden Kollagenhydrolysats entsprechend zu beeinflussen und die positive Wirkung des Hydrolysats auf die Gesundheit von Haut, Haaren und/oder Nägeln zu erhöhen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Kollagenhydrolysat durch die nacheinander folgende Einwirkung von mindestens zwei Endoproteasen mit einer unterschiedlichen Spezifität, insbesondere von mindestens zwei verschiedenen Metalloproteasen und/oder Serinproteasen, hergestellt, d.h. von Proteasen, die die Aminosäuresequenz der Kollagenmoleküle jeweils vor bzw. hinter bestimmten Aminosäuren spalten. Günstigerweise handelt es sich bei den Metalloproteasen und/oder Serinproteasen um Enzyme aus den Mikroorganismen *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus oryzae* und *Aspergillus melleus*.

Durch die Auswahl geeigneter Endoproteasen kann nicht nur die charakteristische Molekulargewichtsverteilung des Kollagenhydrolysats erhalten werden, sondern es wird auch die Art der Aminosäuren an den Termini der in dem Hydrolysat enthaltenen Peptide beeinflusst. In dieser Hinsicht ist es z.B. bevorzugt, wenn mindestens 50% der N-terminalen Aminosäuren des Kollagenhydrolysats hydrophobe Aminosäuren sind, insbesondere Alanin, Leucin und Isoleucin.

Die Erfindung betrifft insbesondere auch die Verwendung des Kollagenhydrolysats zur Stimulation der Biosynthese extrazellulärer Matrixproteine durch Hautzellen. Hautzellen umfassen insbesondere Fibroblasten, die u.a. Kollagen (hauptsächlich vom Typ I), Elastin sowie Proteoglykane synthetisieren. Die Bildung dieser Proteine in ausreichender Menge ist entscheidend für den Aufbau bzw. die Regeneration der extrazellulären Matrix der Haut, die wiederum wesentlich bestimmend ist für die Eigenschaften der Haut wie Spannkraft und Elastizität sowie ihren Feuchtigkeitshaushalt.

Zu den Hautzellen zählen auch die Keratinozyten, die sowohl für die Verhornung der äußersten Hautschicht als auch für die Bildung von Haaren und Nägeln verantwortlich sind. Somit kann eine Stimulation dieser Zellen durch das erfindungsgemäß verwendete Kollagenhydrolysat eine Verbesserung der Barrierefunktion der Haut sowie der Gesundheit der Haare und/oder Nägel bewirken.

Ein wesentlicher Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung des Kollagenhydrolyсата zur Erhöhung der Spannkraft der Haut und/oder der Verminderung der Faltenbildung. Diese Eigenschaften der Haut verschlechtern sich in der Regel alterungsbedingt sowie in Folge von Umwelteinflüssen wie z.B. UV-Strahlung oder toxischen Substanzen. Da für die Spannkraft und Elastizität der Haut insbesondere die Matrixproteine Kollagen und Elastin verantwortlich sind, kann durch deren vermehrte Synthese, die durch das erfindungsgemäß verwendete Kollagenhydrolysat in besonderem Maße stimuliert wird, diesen Effekten entgegengewirkt und die Hautgesundheit deutlich verbessert werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung des Kollagenhydrolyсата zur Erhöhung des Feuchtigkeitsgehalts der Haut. Einen wesentlichen Beitrag zur Fähigkeit der Haut, ausreichende Mengen an Feuchtigkeit zu binden, leisten die in der extrazellulären Matrix enthaltenen Proteoglykane (z.B. Versican, Biglykan und Decorin), deren Synthese durch das erfindungsgemäß verwendete Kollagenhydrolysat ebenfalls nachweislich stimuliert wird. Auch der Feuchtigkeitsgehalt der Haut kann durch schädliche Umwelteinflüsse wie UV-Strahlung reduziert sein, wobei der Feuchtigkeitsverlust häufig mit einer geringeren Geschmeidigkeit, Rissigkeit und überschüssigen Verhornung der Haut einhergeht.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung des Kollagenhydrolyсата zur Verbesserung der Barrierefunktion der Haut. Eine wesentliche Rolle für diese Barrierefunktion spielen die so genannten CE-Proteine („Cornified Envelope“-Proteine), u.a. Involucrin, Loricrin und Filaggrin, deren Biosynthese

- 6 -

durch das niedermolekulare Kollagenhydrolysat nachweislich stimuliert wird. Somit wird durch die erfindungsgemäße Verwendung von Kollagenhydrolysat die Verminderung des Feuchtigkeitsverlustes, die Barrierefunktion sowie der natürliche Schutz der Haut gegen pathogene Keime und toxische Substanzen verbessert.

Die erfindungsgemäße Verwendung des Kollagenhydrolyсата führt zusätzlich auch zu einer anti-oxidativen Wirkung im Bereich der Haut, wodurch die Häufigkeit von DNA-Schädigungen (Mutationen), z.B. durch UV-Strahlung oder mutagene Substanzen, reduziert werden kann. Solche Mutationen stellen eine der Ursachen für die frühzeitige Alterung von Zellen dar und fördern dadurch Alterungserscheinungen der Haut (Nachlassen der Spannkraft, Faltenbildung usw.), sodass dieser Vorgang durch die erfindungsgemäße Verwendung gehemmt werden kann.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Kollagenhydrolysat für eine orale Aufnahme vorgesehen. Bei oraler Aufnahme ergibt sich häufig ein effektiverer Transport des Kollagenhydrolyсата über den Blutkreislauf zum Wirkungsort, d.h. insbesondere zu den Hautzellen, als bei einer topischen Anwendung. Zudem ist diese Anwendungsform für den Benutzer in der Regel mit einem wesentlich geringeren Aufwand verbunden.

Vorzugsweise wird das Kollagenhydrolysat als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt. Das Kollagenhydrolysat dient dabei in der Regel der Verbesserung der Hautgesundheit im Sinne einer allgemeinen Gesundheitsvorsorge oder auch einer kosmetischen Anwendung; solche Nahrungsergänzungsmittel können als „Nutraceuticals“ oder „Nutricosmetics“ bezeichnet werden. Aber auch eine Verwendung des Kollagenhydrolyсата zur Behandlung eines klinischen Krankheitsbildes ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung möglich, so z.B. bei Vorliegen einer atopischen Dermatitis, bei der die Patienten eine erhöhte Neigung zu trockener, rissiger Haut haben.

- 7 -

Das Nahrungsergänzungsmittel kann in nahezu beliebiger Form angeboten werden, z.B. in Form von Tabletten, Kapseln, Dragees, Pastillen oder auch einer Lösung (z.B. in Einzelampullen oder in Getränken).

Das Kollagenhydrolysat kann alternativ auch in einem Nahrungs- oder Genussmittel enthalten sein, z.B. in Süßwaren oder in einem Instantpulver zur Zubereitung von Getränken. Das Hydrolysat kann auf diese Weise vom Benutzer ohne zusätzlichen Aufwand im Rahmen der normalen Ernährung aufgenommen werden (so genanntes „Functional Food“). In diesem Zusammenhang ist es besonders vorteilhaft, wenn das Kollagenhydrolysat im Wesentlichen geschmacksneutral ist.

Günstig ist es, wenn eine täglich Aufnahme von ca. 1,5 bis 5 g, bevorzugt ca. 2 bis 3 g, weiter bevorzugt ca. 2,3 bis 2,7 g des Kollagenhydrolysats vorgesehen ist. Es hat sich gezeigt, dass durch die orale Aufnahme dieser Menge an Hydrolysat bereits innerhalb von wenigen Wochen die Hautgesundheit merklich verbessert werden kann.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft die topische Anwendung des Kollagenhydrolysats, d.h. die Anwendung in Form von kosmetischen Produkten zum Aufbringen auf die Haut, die Haare und/oder die Nägel. Das Kollagenhydrolysat kann dabei insbesondere in einer Creme, einer Salbe, einer Lotion oder einem Gel enthalten sein. Günstig ist es auch, wenn das Kollagenhydrolysat einem Körperpflegeprodukt wie z.B. einem Duschgel oder einem Haarshampoo beigefügt wird, beispielsweise in einer Menge von ca. 5 bis 10 Gew.%.

Diese und weitere Vorteile der Erfindung werden anhand der nachfolgenden Beispiele unter Bezugnahme auf die Figuren näher beschrieben. Es zeigen im Einzelnen:

Figuren 1A bis 1C: Diagramme betreffend die Stimulation der Synthese von Typ-I-Kollagen, Biglykan bzw. Versican;

Figuren 2A und 2B: Diagramme betreffend die Erhöhung der Hautfeuchtigkeit bei haarlosen Mäusen;

Figur 3: ein Diagramm betreffend die Stimulation der Synthese von CE-Proteinen;

Figur 4A bis 4C: MALDI-Massenspektren verschiedener Kollagenhydrolysate; und

Figur 5A und 5B: Diagramme betreffend die Stimulation der Synthese von Typ-I-Kollagen, Decorin und Versican.

Beispiele

1. Herstellung und Eigenschaften des Kollagenhydrolysats

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Kollagenhydrolysats wird als Ausgangsmaterial eine wässrige Lösung einer Schweineschwartengelatine (Typ A, 200 bis 250 g Bloom) mit einer Konzentration von 20 bis 40 Gew.% (Trockensubstanz) eingesetzt. Die Gelatine wird durch die nacheinander folgende Einwirkung von zwei verschiedenen Endoproteasen mikrobiellen Ursprungs bei 50 bis 60 °C während 120 bis 180 min enzymatisch hydrolysiert, wobei als erstes Enzym eine Endoprotease aus *Bacillus subtilis* oder aus *Bacillus amyloliquefaciens* verwendet wird und als zweites Enzym eine Endoprotease aus *Bacillus licheniformis*. Anschließend werden die Enzyme thermisch inaktiviert und die Lösung sprühgetrocknet.

Die Molekulargewichtsverteilung des resultierenden Kollagenhydrolysats kann mittels Gelpermeationschromatographie unter Verwendung der folgenden Parameter bestimmt werden:

Stationäre Phase: TSK 2000 SW XL (Tosoh Bioscience GmbH)

- 9 -

Mobile Phase: 0,4 mol/l Natriumdihydrogenphosphat pH 5,3
 Flussrate: 0,5 ml/min
 Kalibrierungsstandard: definierte Kollagen-Typ-I-Fragmente (FILK, Freiberg)
 Detektion: UV-Detektor Knauer K-2501 bei 214 nm

Die Bestimmung ergab eine Molekulargewichtsverteilung des erfindungsgemäßen Kollagenhydrolysats (im Folgenden als niedermolekulares Hydrolysat bezeichnet) gemäß der nachfolgenden Tabelle 1. Zum Vergleich ist in der Tabelle 1 auch die Molekulargewichtsverteilung eines kommerziell erhältlichen Kollagenhydrolysats angegeben, die mit derselben Methode bestimmt wurde (im Folgenden als hochmolekulares Hydrolysat bezeichnet):

Tabelle 1

MW-Bereich	niedermol. Hydrolysat	hochmol. Hydrolysat
> 7.500 Da	< 5 Gew.%	< 10 Gew.%
3.500 – 7.500 Da	ca. 12-18 Gew.%	ca. 25-35 Gew.%
1.500 – 3.500 Da	ca. 25-31 Gew.%	ca. 29-35 Gew.%
500 – 1.500 Da	ca. 40-46 Gew.%	ca. 24-30 Gew.%
< 500 Da	ca. 5-10 Gew.%	ca. 2-5 Gew.%

Der Hydroxyprolinegehalt dieses niedermolekularen Hydrolysats beträgt ca. 12 bis 13 Gew.% und kann nach Oxidation mit Chloramin-T und Umsetzung mit p-Dimethylamino-benzaldehyd photometrisch bestimmt werden. Mehr als 50% der N-terminalen Aminosäuren des Hydrolysats sind hydrophobe Aminosäuren, insbesondere Alanin, Leucin und Isoleucin.

2. Stimulation der Synthese von extrazellulären Matrixproteinen

Die Stimulation der Synthese von Kollagen (Typ I) sowie der Proteoglykane Biglykan und Versican wurde *in vitro* an humanen dermalen Fibroblasten (Hautzellen) untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 24 Stunden mit jeweils 0,5 mg/ml des niedermolekularen bzw. des hochmolekularen Hydrolysats in-

- 10 -

kubiert und anschließend die Expression von Kollagen-RNA, Biglykan-RNA und Versican-RNA mittels Realtime-PCR bestimmt und semiquantitativ (bezogen auf eine Kontrolle ohne Hydrolysat) ausgewertet.

Die Ergebnisse sind als Säulendiagramme für Typ-I-Kollagen in der Figur 1A, für Biglykan in der Figur 1B und für Versican in der Figur 1C dargestellt, wobei die Diagramme jeweils den Mittelwert aus mindestens 18 Messungen zeigen. Auf der Abszisse ist die RNA-Expression relativ zur Kontrolle (=1) aufgetragen. Die linke ausgefüllte Säule steht jeweils für die Kontrolle, die mittlere schraffierte Säule für das hochmolekulare Hydrolysat (als Vergleich) und die rechte gepunktete Säule für das niedermolekulare Hydrolysat (gemäß der Erfindung).

Es zeigt sich, dass die Synthese aller drei Matrixproteine durch beide Kollagenhydrolysate stimuliert wird, wobei der positive Effekt des niedermolekularen Hydrolysats jeweils stärker ausgeprägt ist als derjenige des hochmolekularen Hydrolysats. Beim Kollagen, welches neben Elastin hauptverantwortlich für die Spannkraft und Elastizität der Haut ist, sowie beim Versican, das für den Feuchtigkeitshaushalt der Haut eine wichtige Rolle spielt, fällt der verstärkte Effekt des niedermolekularen Hydrolysats besonders deutlich aus.

3. Erhöhung des Feuchtigkeitsgehalts der Haut

Die Beeinflussung der Hautfeuchtigkeit durch Kollagenhydrolysat wurde an haarlosen Mäusen direkt untersucht. Haarlose Mäuse stellen ein etabliertes Modellsystem dar, das bei dermatologischen Fragestellungen häufig eingesetzt wird, und die daraus gewonnenen Erkenntnisse sind prinzipiell auf die menschliche Haut übertragbar (siehe z.B. T. Fujimura et al.; *J. Dermatol. Sci.* 2000 (24) 105-111 und Y. Nishimori et al.; *J. Invest. Dermatol.* 2001 (117) 1458-1463).

Die Tiere wurden während eines Zeitraums von drei Wochen täglich mit 150 µg Kollagenhydrolysat pro kg Körpergewicht gefüttert, die Kontrollgruppe erhielt stattdessen BSA. Gleichzeitig erhielten alle Tiere eine wöchentliche UV-B-

- 11 -

Strahlungsdosis von 18 mJ/cm² Hautoberfläche, wodurch die Hautfeuchtigkeit negativ beeinflusst wird.

Der Feuchtigkeitsgehalt der Haut wurde nach einer Woche und nach drei Wochen mit einem Corneometer CM 825 (Hersteller: Courage & Khazaka) gemessen. Das Messprinzip beruht hierbei auf der Änderung der Kapazität eines Messkondensators durch die Dielektrizitätskonstante des in den oberen Hautschichten gebundenen Wassers, die sich von den Dielektrizitätskonstanten der meisten anderen Stoffe deutlich unterscheidet.

Die Ergebnisse sind als Säulendiagramme für die Messung nach einer Woche in der Figur 2A und für die Messung nach drei Wochen in der Figur 2B dargestellt, wobei die Diagramme jeweils den Mittelwert und den Standardfehler aus 7 Messungen zeigen. Auf der Abszisse ist die Hautfeuchtigkeit relativ zur Kontrolle (=1) aufgetragen. Die linke ausgefüllte Säule steht jeweils für die Kontrolle, die mittlere schraffierte Säule für das hochmolekulare Hydrolysat (als Vergleich) und die rechte gepunktete Säule für das niedermolekulare Hydrolysat (gemäß der Erfindung).

Es zeigt sich, dass die Erhöhung der Hautfeuchtigkeit durch das niedermolekulare Hydrolysat sowohl nach einer Woche als auch nach drei Wochen jeweils stärker ist als durch das hochmolekulare Hydrolysat. Dies ist ein weitere Beleg für die besondere Wirksamkeit des erfindungsgemäß verwendeten Hydrolysats bei der Verbesserung der Hautgesundheit.

4. Stimulation der Synthese von CE-Proteinen

So genannte „Cornified Envelope“-Proteine spielen eine wichtige Rolle für die Barrierefunktion der Haut gegen das Eindringen von pathogenen Keimen und toxischen Substanzen. Die Synthese der CE-Proteine Involucrin, Loricrin und Filaggrin wurde bei haarlosen Mäusen bestimmt, die zuvor fünf Wochen mit täglich 150 µg Kollagenhydrolysat pro kg Körpergewicht gefüttert wurden (wie oben beschrieben). Die Quantifizierung der Proteine relativ zu einer Kontroll-

- 12 -

gruppe (Fütterung mit BSA) erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot mit spezifischen Antikörpern nach Extraktion der Proteine aus der Haut.

Die Ergebnisse sind als Säulendiagramm in der Figur 3 dargestellt, wobei das Diagramm jeweils den Mittelwert und den Standardfehler aus 7 Messungen zeigt. Auf der Abszisse ist die Menge der CE-Proteine nach Fütterung mit dem niedermolekularen Hydrolysat relativ zur Kontrolle (=1) aufgetragen. Die linke Säule steht für Involucrin, die mittlere Säule für Loricrin und die rechte Säule für Filaggrin.

Es zeigt sich, dass die Synthese aller drei untersuchten CE-Proteine durch die orale Aufnahme des erfindungsgemäß verwendeten Kollagenhydrolysats stimuliert wird, im Fall von Involucrin sogar um mehr als das Dreifache.

5. Anti-oxidative Wirkung des Kollagenhydrolysats

Die anti-oxidative Wirkung des niedermolekularen Kollagenhydrolysats wurde in einem zellfreien System mittels eines Malondialdehyd-Assays ermittelt.

Dabei zeigte sich, dass die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies durch das Kollagenhydrolysat um durchschnittlich ca. 7% verringert wird. Im Bereich der Haut kann dadurch die Häufigkeit von DNA-Schädigungen reduziert werden, sodass Alterungserscheinungen durch die erfindungsgemäße Verwendung entgegengewirkt werden kann.

6. Analyse der Molekulargewichtsverteilung mittels MALDI-MS

Das gemäß Beispiel 1 hergestellte, niedermolekulare Kollagenhydrolysat gemäß der Erfindung, das ein mittleres Molekulargewicht von ca. 2.000 Da aufweist (im folgenden Hydrolysat A), wurde zwei kommerziell erhältlichen Kollagenhydrolysaten mit einem mittleren Molekulargewicht von ca. 2.100 Da (im

Folgenden Hydrolysat B) und ca. 2.900 Da (im Folgenden Hydrolysat C) gegenübergestellt.

Die genauen Molekulargewichtsverteilungen dieser drei Hydrolysate wurden mittels MALDI-Massenspektroskopie (MALDI-MS) analysiert. Hierzu wurden die Proben in 0,1%iger Trifluoressigsäure auf eine Endkonzentration von 10 µg/µl eingestellt und anschließend unter Verwendung von µC₁₈-Material gereinigt. Die Proben wurden mit einer HCCA-Matrix auf ein MALDI-Target präpariert und die Massenspektren unter Verwendung eines Ultraflex-III-TOF/TOF-Massenspektrometers (Hersteller: Bruker Daltonics) bestimmt.

Die Figuren 4A bis 4C zeigen die entsprechenden Massenspektren bzw. Molekulargewichtsverteilungen der Kollagenhydrolysate A, B bzw. C, wobei auf der Ordinate das Molekulargewicht bzw. die Massenzahl und auf der Abszisse die Intensität aufgetragen ist. Ein Vergleich der drei Spektren zeigt, dass das erfindungsgemäße Hydrolysat A die folgenden charakteristischen Peptide gemäß der Tabelle 2 umfasst, wobei die entsprechenden Peaks eine doppelte bis vierfache Intensität im Vergleich zu ihrer Umgebung aufweisen:

Tabelle 2

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

Insbesondere die vier Peptide zwischen 600 und 1.500 Da haben keine Entsprechungen bei den beiden kommerziellen Hydrolysaten B und C, und sind somit für das Hydrolysat A besonders charakteristisch.

7. Stimulation der Synthese von extrazellulären Matrixproteinen

Die Stimulation der Synthese von Kollagen (Typ I) sowie der Proteoglykane Decorin und Versican wurde *in vitro* an humanen dermalen Fibroblasten (Hautzellen) untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 24 Stunden mit jeweils 0,5 mg/ml der Hydrolysate A, B bzw. C inkubiert und anschließend die Expression von Kollagen-RNA, Decorin-RNA und Versican-RNA mittels Realtime-PCR bestimmt und semiquantitativ ausgewertet. Decorin spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung der Kollagenfasern in der Haut.

Die Ergebnisse sind als Säulendiagramme für das Hydrolysat B in der Figur 5A und für das Hydrolysat C in der Figur 5B dargestellt, wobei auf der Abszisse jeweils die RNA-Expression bei den kommerziellen Hydrolysaten B bzw. C relativ zur RNA-Expression bei dem erfindungsgemäßen Hydrolysat A (=1) aufgetragen ist. Die linke Säule steht jeweils für Typ-I-Kollagen, die mittlere Säule für Decorin und die rechte Säule für Versican. Es ist jeweils der Mittelwert aus mindestens 7 Messungen dargestellt sowie der Standardfehler.

Interessanterweise zeigen die Daten, dass bei allen drei Matrixproteinen eine im Vergleich zum Hydrolysat A deutlich geringere Stimulation der RNA-Synthese durch die beiden Hydrolysate B und C erfolgt, deren mittleres Molekulargewicht nur geringfügig höher ist. Die charakteristischen Peptide des Hydrolysats A scheinen somit eine entscheidende Rolle für dessen vorteilhafte Wirkung zu spielen.

8. Beispielrezepturen für Nahrungs(ergänzungs)mittel und Kosmetika

Im Folgenden sind einige beispielhafte Rezepturen für die Verwendung des Kollagenhydrolysats gemäß der Erfindung angegeben, die selbstverständlich in vielfältiger Weise abgewandelt werden können:

- 15 -

Kapsetten (Nahrungsergänzungsmittel)

Glycerin	53,67 Gew.%
Kollagenhydrolysat	21,95 Gew.%
Gelatine	10,08 Gew.%
Guarkernmehl	6,00 Gew.%
Lecithin	5,00 Gew.%
Citronensäure	2,00 Gew.%
Aroma (Cassis)	0,50 Gew.%
Orangenöl	0,50 Gew.%
Acesulfam-K	0,30 Gew.%

Schokolade

Kakaomasse	51,0 Gew.%
Saccharose	22,4 Gew.%
Kakaobutter	16,6 Gew.%
Kollagenhydrolysat	10,0 Gew.%

Getränk

Wasser	63,00 Gew.%
Aloe-Vera-Konzentrat	31,00 Gew.%
Kollagenhydrolysat	4,00 Gew.%
Saccharose	1,50 Gew.%
Citronensäure	0,26 Gew.%
Aromen und Farbst.	0,24 Gew.%
Sucralose	0,0031 Gew.%

Haarshampoo

Wasser	58,8 Gew.%
Natriumlaureth-11-carboxylat	18,0 Gew.%
Cocoamidopropyl-Betain	9,0 Gew.%
Kollagenhydrolysat	6,0 Gew.%
PEG-6 Capryl/Caproyl-Glyceride	3,0 Gew.%

- 16 -

PEG-150 Distearat	2,5 Gew.%
Laureth-7	2,0 Gew.%
Kaliumsorbat	0,5 Gew.%
Parfum	0,2 Gew.%

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Kollagenhydrolysat für die Verwendung zur Verbesserung der Gesundheit der menschlichen Haut, Haare und/oder Nägel, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 90 Gew.% des Kollagenhydrolyсата ein Molekulargewicht von weniger als 3.500 Da aufweisen, und dass das Kollagenhydrolysat mindestens vier charakteristische Peptide mit einem Molekulargewicht zwischen 600 und 1.200 Da umfasst.
2. Kollagenhydrolysat nach Anspruch 1, wobei mindestens 45 Gew.% des Kollagenhydrolyсата ein Molekulargewicht von weniger als 1.500 Da aufweisen.
3. Kollagenhydrolysat nach Anspruch 1 oder 2, wobei die mindestens vier charakteristischen Peptide in einer mittels MALDI-Massenspektroskopie bestimmten Molekulargewichtsverteilung eine mindestens doppelte Intensität, bevorzugt eine mindestens vierfache Intensität im Vergleich zu ihrer Umgebung aufweisen.
4. Kollagenhydrolysat nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Kollagenhydrolysat ein Peptid zwischen 620 und 690 Da, ein Peptid zwischen 790 und 860 Da, ein Peptid zwischen 980 und 1.050 Da und ein Peptid zwischen 1.175 und 1.245 Da umfasst.
5. Kollagenhydrolysat nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Kollagenhydrolysat weitere charakteristische Peptide mit einem Molekulargewicht zwischen 1.500 und 3.500 Da umfasst.
6. Kollagenhydrolysat nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Kollagenhydrolysat einen Anteil an Hydroxyprolin von 12 Gew.% oder mehr aufweist.

7. Kollagenhydrolysat nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Kollagenhydrolysat durch enzymatische Hydrolyse von Gelatine hergestellt ist.
8. Kollagenhydrolysat nach Anspruch 7, wobei das Kollagenhydrolysat durch die nacheinander folgende Einwirkung von mindestens zwei Endoproteasen mit einer unterschiedlichen Spezifität, insbesondere von mindestens zwei verschiedenen Metalloproteasen und/oder Serinproteasen, hergestellt ist.
9. Kollagenhydrolysat nach Anspruch 8, wobei die Metalloproteasen und/oder Serinproteasen ausgewählt sind aus Enzymen aus den Mikroorganismen *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus oryzae* und *Aspergillus melleus*.
10. Kollagenhydrolysat nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mindestens 50% der N-terminalen Aminosäuren des Kollagenhydrolysats hydrophobe Aminosäuren sind, insbesondere Alanin, Leucin und Isoleucin.
11. Kollagenhydrolysat nach einem der vorangehenden Ansprüche für die Verwendung zur Stimulation der Biosynthese extrazellulärer Matrixproteine durch Hautzellen.
12. Kollagenhydrolysat nach einem der vorangehenden Ansprüche für die Verwendung zur Erhöhung der Spannkraft der Haut und/oder der Verminderung der Faltenbildung.
13. Kollagenhydrolysat nach einem der vorangehenden Ansprüche für die Verwendung zur Erhöhung des Feuchtigkeitsgehalts der Haut.

- 19 -

14. Kollagenhydrolysat nach einem der vorangehenden Ansprüche für die Verwendung zur Verbesserung der Barrierefunktion der Haut.
15. Kollagenhydrolysat nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Kollagenhydrolysat für eine orale Aufnahme vorgesehen ist.
16. Kollagenhydrolysat nach Anspruch 15, wobei das Kollagenhydrolysat ein Nahrungsergänzungsmittel ist.
17. Kollagenhydrolysat nach Anspruch 15, wobei das Kollagenhydrolysat in einem Nahrungs- oder Genussmittel enthalten ist.
18. Kollagenhydrolysat nach einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei eine tägliche Aufnahme von ca. 1,5 bis 5 g, bevorzugt ca. 2 bis 3 g, weiter bevorzugt ca. 2,3 bis 2,7 g des Kollagenhydrolyсата vorgesehen ist.
19. Kollagenhydrolysat nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei das Kollagenhydrolysat für eine topische Anwendung vorgesehen ist.
20. Kollagenhydrolysat nach Anspruch 19, wobei das Kollagenhydrolysat in einer Creme, einer Salbe, einer Lotion, einem Gel oder einem Shampoo enthalten ist.

1 / 6

Fig. 1A

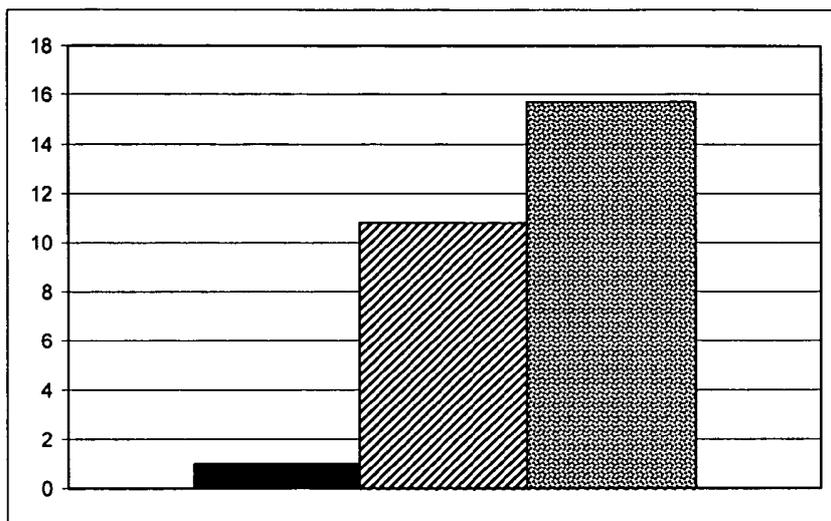
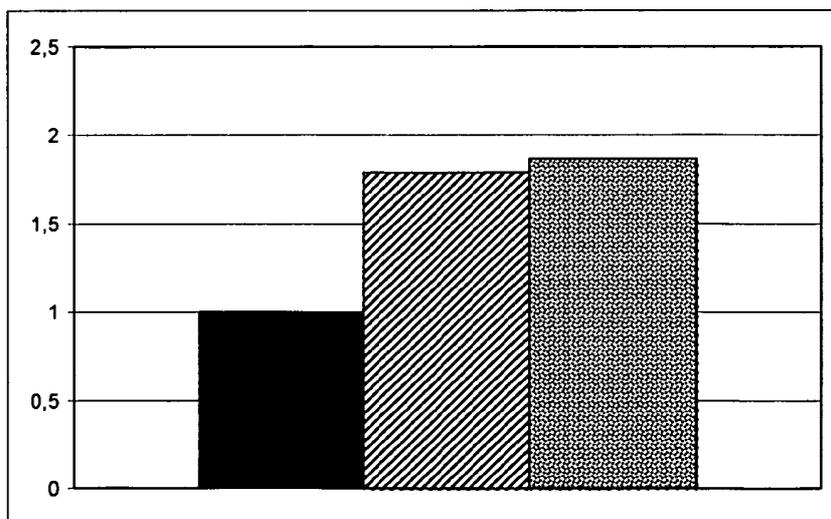


Fig. 1B



2 / 6

Fig. 1C

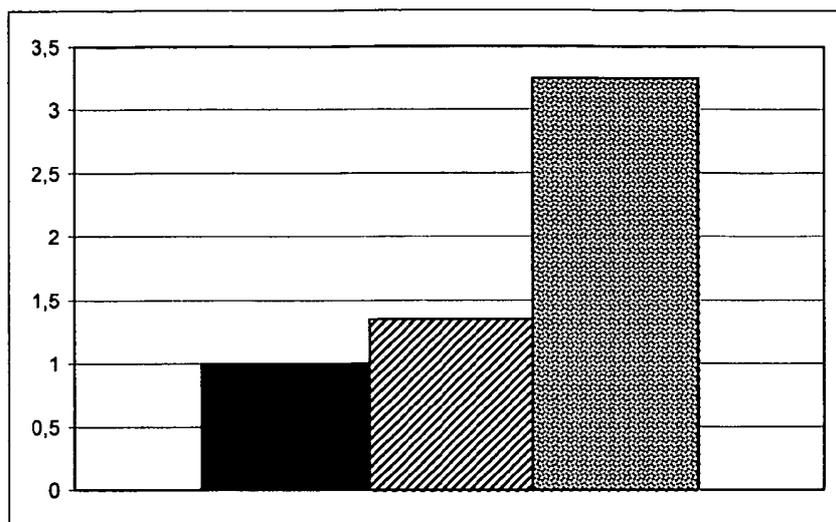
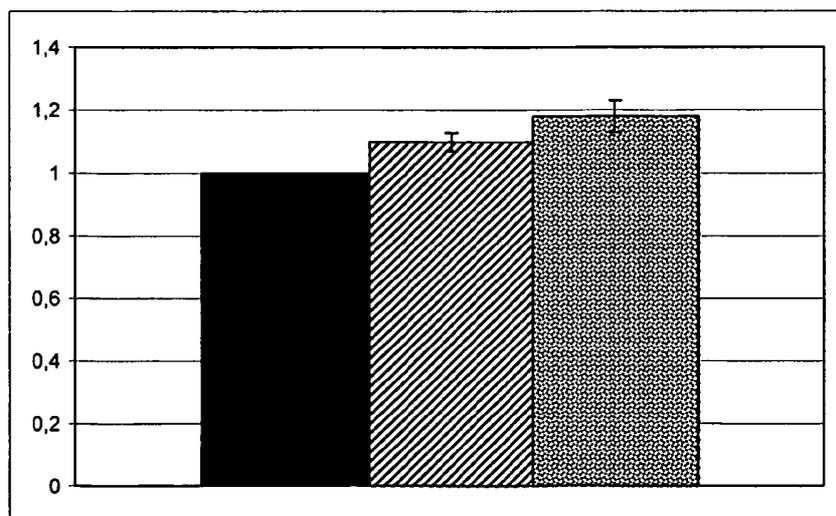


Fig. 2A



3 / 6

Fig. 2B

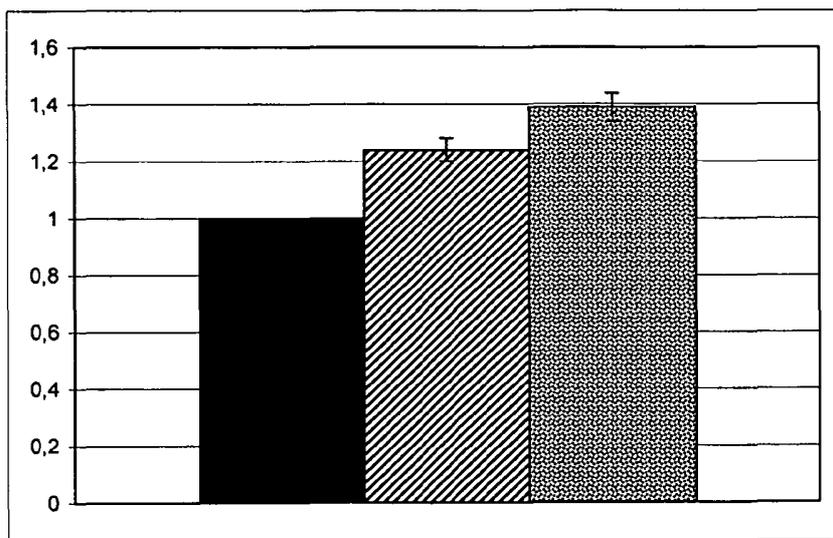
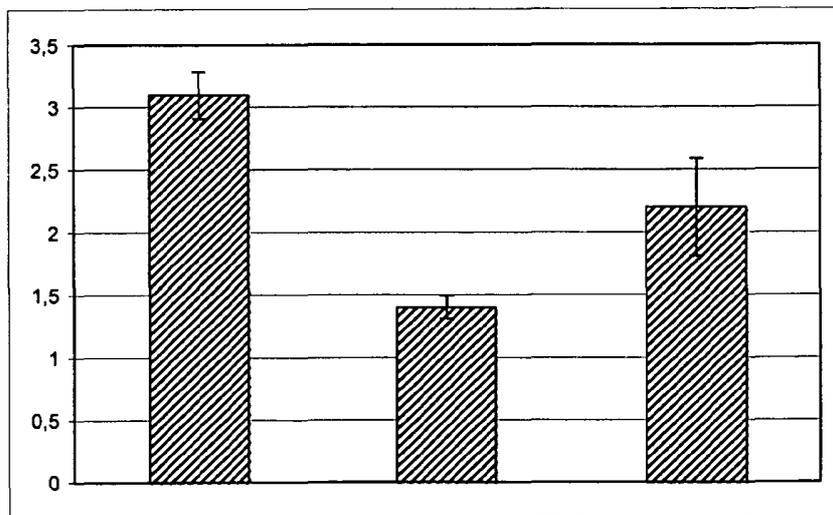


Fig. 3



4 / 6

Fig. 4A

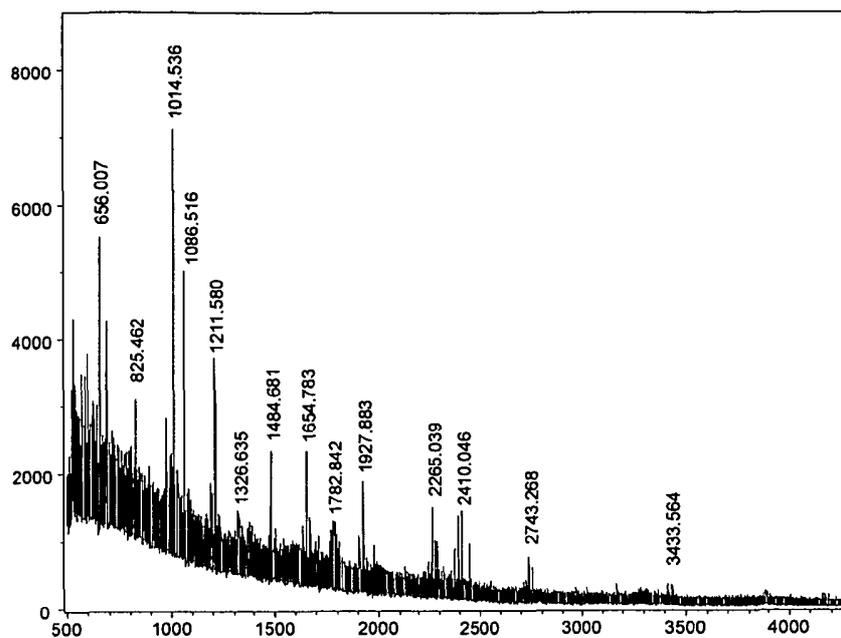


Fig. 4B

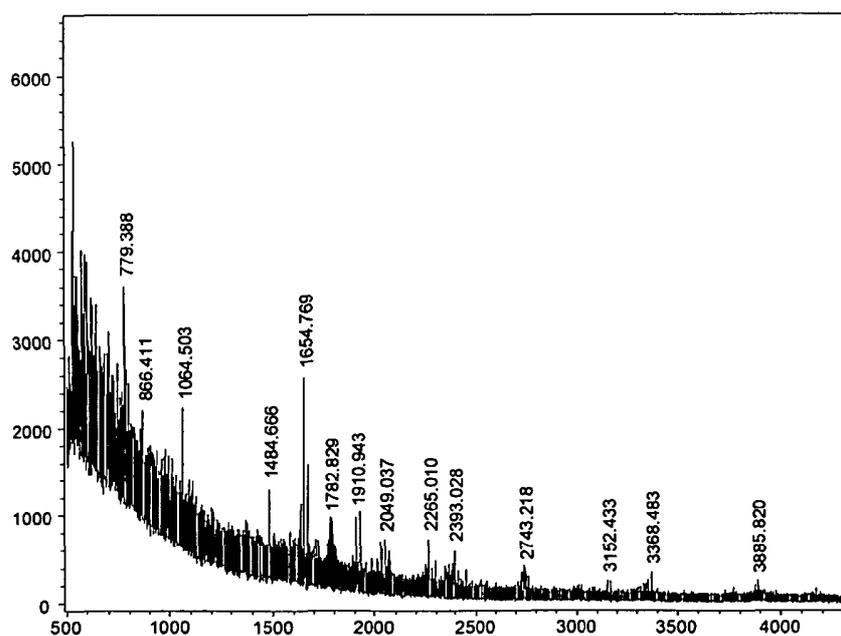
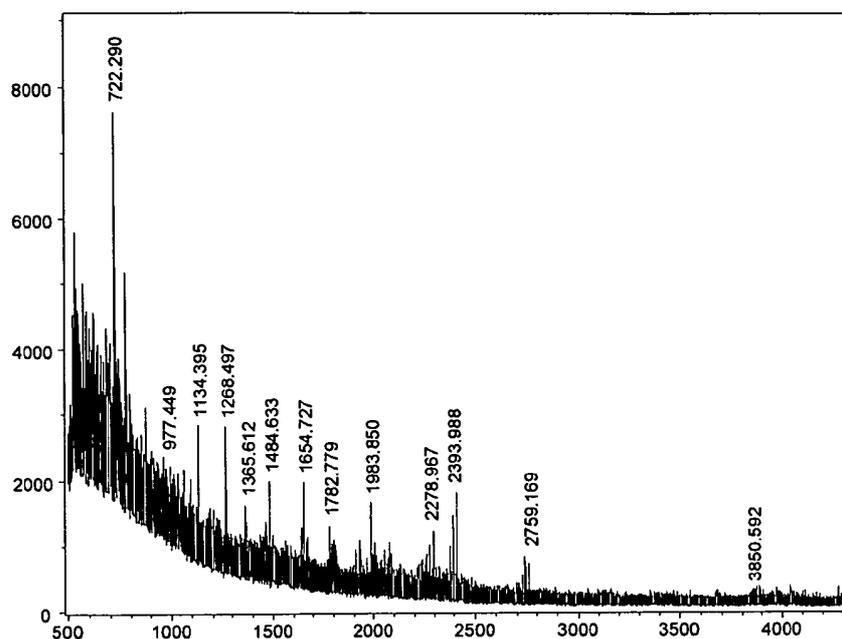


Fig. 4C



6 / 6

Fig. 5A

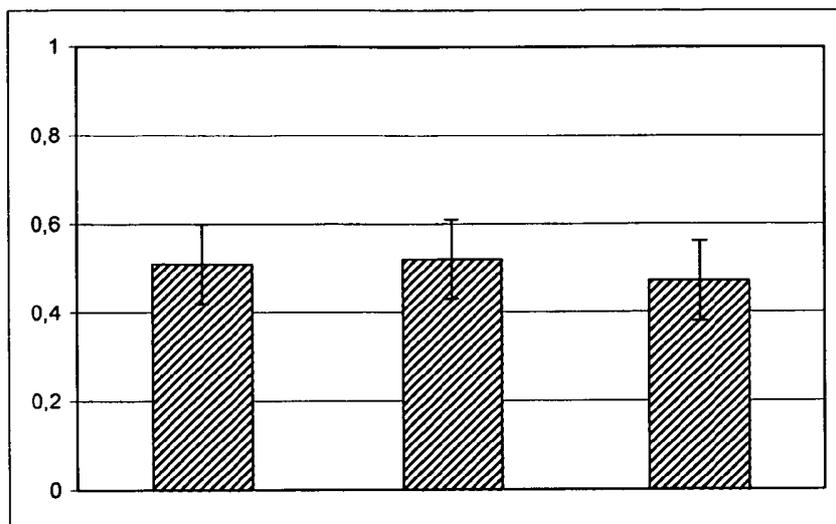


Fig. 5B

