

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 969 654**

51 Int. Cl.:

C09H 3/02 (2006.01)

C08H 1/06 (2006.01)

C08L 89/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2018 PCT/EP2018/082238**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2019 WO19101864**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2018 E 18804012 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024 EP 3714014**

54 Título: **Método para la preparación de hidrolizado de gelatina que tiene un bajo contenido de endotoxinas**

30 Prioridad:

23.11.2017 EP 17203341

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

21.05.2024

73 Titular/es:

**ROUSSELOT BVBA (100.0%)
Meulestedekaaï 81
9000 Gent, BE**

72 Inventor/es:

**OLIJVE, JOSEPH HUBERTUS;
BAKHUIZEN, ELINE y
STEVENS, PAUL**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 969 654 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la preparación de hidrolizado de gelatina que tiene un bajo contenido de endotoxinas

5 La presente invención se refiere a un método para la preparación de un hidrolizado de gelatina que tiene un bajo contenido de lipopolisacáridos (LPS).

10 La gelatina es una mezcla de proteínas solubles en agua derivadas del colágeno. La gelatina se obtiene, por ejemplo, mediante la hidrólisis parcial del colágeno, obtenido mediante la extracción acuosa de la piel, tendones, ligamentos, huesos, etc., en condiciones ácidas o alcalinas, o mediante hidrólisis enzimática. La gelatina obtenida mediante tratamiento ácido se llama gelatina de Tipo A, mientras que la gelatina de Tipo B se obtiene a partir de un proceso alcalino.

15 La gelatina no constituye una molécula de proteína uniforme, sino que comprende una cantidad variable de moléculas de proteína de longitud variable, con un peso molecular promedio de hasta 200-250 kDa. Por lo tanto, la distribución del peso molecular de la gelatina es un parámetro importante que determina con frecuencia propiedades críticas e importantes de la gelatina, tales como la viscosidad y el valor de dureza, o la fuerza del gel.

20 La gelatina forma un gel termorreversible a temperatura ambiente y se disuelve en agua caliente. La gelatina se usa comúnmente en diversas industrias, por ejemplo, en aplicaciones alimentarias, farmacéuticas y cosméticas, entre otras, como agente gelificante y texturizante en, por ejemplo, gominolas y postres de gelatina, pero también encuentra aplicación en el campo médico, por ejemplo, para la sustitución de plasma e implantes a base de gelatina.

25 El peso molecular varía, entre otros factores, debido a diferentes temperaturas y condiciones de extracción. Como resultado, también variarán la dureza y la viscosidad. La temperatura es un parámetro importante en la preparación de gelatina, por ejemplo, en las condiciones de purificación antes de que la gelatina pueda usarse en aplicaciones alimentarias, farmacéuticas, técnicas y médicas, y a menudo requiere un control cuidadoso. En lo que respecta al uso de gelatina, en aplicaciones donde las características de gelificación y viscosidad son importantes, se considera como temperatura máxima de manipulación una temperatura de 60 °C, aunque temperaturas de hasta, por ejemplo, 62 °C o 65 °C durante un período de tiempo limitado de, por ejemplo, 5 o 10 a 30 o 45 min. pueden ser aceptables bajo ciertas circunstancias cuando se tolera cierta pérdida de capacidad de gelificación y/o viscosidad.

35 La distribución del peso molecular de la gelatina se suele medir mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución por exclusión de tamaño (HPLC), y las fracciones eluidas se detectan mediante adsorción UV y los datos medidos se evalúan mediante un programa informático adecuado, todas técnicas conocidas en la técnica, ver por ejemplo Olijve et al., *Journal of Colloid and Interface Science* (2001) 243, 476-482. Para gelatinas hidrolizadas con un peso molecular promedio menor a 70 kDa, tal como menor a 20 kDa, se puede usar el mismo método, pero se prefiere usar una columna de separación, tal como TSKgel2000SWXL (Tosoh BioScience, Japón), para obtener una alta resolución (Zhang et al., *Food Hydrocolloids* 23 (2009) 2001-2007).

40 La viscosidad de la gelatina (la viscosidad dinámica) se suele medir midiendo el tiempo de flujo de una solución de gelatina al 6.67 % p/p a través de una pipeta de flujo estándar a 60 °C, ver la monografía *GME Standardized Methods for the testing of Edible Gelatin*, versión 10, 2014 (GME, Bruselas, Bélgica), también denominada 'GME10', capítulo 2.4.2, p. 81 - 86.

45 La fuerza del gel de un gel de gelatina al 6,67 % p/p se puede determinar mediante aparatos estandarizados (ver GME10), tal como un Analizador de Textura QTS 25 (Brookfield Viscometers) o un Analizador de Textura TA-XT2 (Stable Micro Systems Ltd., Londres, Reino Unido), y se indica mediante un número de dureza (también denominado aquí 'valor de dureza', ver GME10).

50 A temperaturas superiores a 65 °C, en particular por encima de 70 °C, ocurre la hidrólisis de la gelatina, es decir, la descomposición de las moléculas de proteína en péptidos más pequeños, lo que resulta en una menor fuerza del gel o incluso pérdida de la capacidad de gelificación. Lo mismo ocurre a pH bajo. En consecuencia, la llamada "gelatina hidrolizada" es una preparación de péptidos que proviene de la hidrólisis de la gelatina en moléculas de péptido con un peso molecular promedio de 70 kDa o menos, generalmente 20 kDa o menos, usualmente entre 100 y 15 000 Da. Debido a las moléculas relativamente pequeñas, la gelatina hidrolizada no tiene propiedades de gelificación, es decir, no es capaz de formar gel cuando se mantiene a 0 °C durante 6 horas (definición de la Farmacopea). La gelatina hidrolizada se usa, por ejemplo, como acondicionador de textura y humectante en cremas tópicas, y también se usa en productos nutricionales debido a su alto contenido de glicina, prolina e hidroxiprolina, y está asociada con efectos beneficiosos para la salud, y cada vez se usa más en aplicaciones biomédicas. También se le llama 'colágeno hidrolizado', ya que el colágeno se hidroliza primero en gelatina y luego se hidroliza aún más en un hidrolizado no gelificante. El hidrolizado de gelatina se prepara usualmente mediante la hidrólisis enzimática de la gelatina.

65 Existe una creciente necesidad de hidrolizado de gelatina que pueda usarse para fines biomédicos, es decir, que tenga un bajo contenido de endotoxinas. En los procesos de preparación de gelatina, a menudo las materias primas están

contaminadas por bacterias y como resultado, las preparaciones de gelatina comunes pueden contener lipopolisacáridos (LPS).

Los lipopolisacáridos se encuentran en la membrana externa de las bacterias gramnegativas y son toxinas potenciales. Los LPS también se conocen como "endotoxinas" ya que los lipopolisacáridos no son secretados por las bacterias, sino que forman parte de la estructura de la membrana. Los lipopolisacáridos se liberan principalmente después de la muerte y lisis de la célula bacteriana.

Los LPS consisten en una cadena variable de polisacáridos y una porción lipídica, el lípido A. Las moléculas de LPS tienen un tamaño de aproximadamente 10 kDa, pero pueden formar grandes agregados en medios acuosos, también llamados "micelas", con un peso molecular de hasta 1000 kDa.

Los LPS son tóxicos para la mayoría de los mamíferos y el huésped animal a menudo sufrirá una amplia gama de reacciones fisiopatológicas no específicas, tales como fiebre, taquicardia, disfunción de órganos e incluso la muerte.

Aunque se puede tolerar determinado contenido de LPS en muchas aplicaciones de hidrolizados de gelatina, en aplicaciones específicas, especialmente en medicina, tal como en inyectables, vacunas y parenterales, el nivel de endotoxinas debería ser preferiblemente inferior a 20, más preferiblemente 10 EU/g, incluso más preferiblemente inferior a 6, 5 o incluso menos de 4 EU/g. Por ejemplo, las regulaciones gubernamentales de Estados Unidos de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) permiten un máximo de 0,5 EU/ml o 20 EU/dispositivo para productos que están en contacto con el sistema cardiovascular y/o linfático. Para los dispositivos en contacto con el líquido cefalorraquídeo, el límite es incluso de 0.06 EU/ml o 2.15 EU/dispositivo (~2 EU/g de gelatina). Para los dispositivos que están en contacto directo o indirecto con el entorno intraocular, puede aplicarse un límite de endotoxinas aún más bajo.

El ensayo de Limulus (LAL) es un bioensayo bien conocido en la técnica para medir cantidades de LPS de hasta subpicogramos. El lisado de amebocitos de Limulus (LAL) es un extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) del cangrejo herradura, *Limulus polyphemus*. LAL reacciona con la endotoxina bacteriana o lipopolisacárido (LPS), que es un componente de la membrana de las bacterias gramnegativas. Esta reacción es la base de la prueba LAL, que luego se usa para la detección y cuantificación de endotoxinas bacterianas. La FDA de EE. UU., USP 2011, capítulo <85>, aceptó el método LAL recomendado para cuantificar los niveles de LPS, que es el método cromogénico Endosafe, por ejemplo, de Charles River USA. Otros métodos aceptados y recomendados son el método de factor C recombinante EndoZyme de Hyglos GmbH (Alemania). Ambos métodos arrojan valores de medición similares o idénticos y, por lo tanto, pueden usarse indistintamente.

El documento WO 2009/154440 describe un método para la eliminación de LPS de una fuente de gelatina en donde el nivel de endotoxinas inicial de 13,200 EU/g se reduce en 102,1 veces, es decir, a un valor de 105 EU/g. Aunque esta disminución es significativa, los niveles siguen siendo inaceptablemente altos para fines médicos. De acuerdo con el documento WO 2009/154440, una solución acuosa de gelatina al 30 % en peso se calentó a 90 °C en presencia del surfactante Triton X-100, es decir, por encima del punto de turbidez del Triton X-100 (68 - 69 °C), lo que resultó en la pérdida de solubilidad y agregación del surfactante y, por lo tanto, en un proceso de extracción de 3 fases en donde tanto el surfactante agregado como el LPS, unido al adsorbente, se eliminan de la fase acuosa que comprende gelatina purificada mediante centrifugación. Debido a la temperatura de 90 °C, se debe haber producido una hidrólisis significativa de la gelatina, lo que resulta en una disminución significativa del peso molecular de la gelatina inicial y una pérdida intrínseca de funcionalidad, tal como la viscosidad y la fuerza del gel. En el método del documento WO2009/154440 es fundamental que la solución se lleve a condiciones tales que la temperatura de la solución que comprende gelatina, surfactante, adsorbente y LPS esté por encima de la temperatura de punto de turbidez del surfactante en esas condiciones, para permitir que el surfactante se agregue de manera que los agregados puedan eliminarse, junto con los LPS adsorbidos al adsorbente, mediante centrifugación.

El documento WO 2016/085345A1 describe un método para eliminar lipopolisacáridos de un medio acuoso que comprende gelatina y lipopolisacáridos, dicho método comprende los pasos de proporcionar un medio acuoso que comprende gelatina y lipopolisacáridos, añadir al medio acuoso un surfactante formador de micelas.

El documento EP1829946A1 se refiere a un método de fabricación de gelatina con contenido de endotoxinas reducido. El método comprende procesar una solución de material de partida que contiene gelatina que contiene gelatina y una endotoxina con una película de ultrafiltración que tiene un límite de peso molecular que cae dentro de un rango de 20,000 a 300,000.

El uso de un surfactante, adsorbente y pasos laboriosos de centrifugación, aunque no llega a niveles bajos de endotoxina que harían interesante el hidrolizado para aplicaciones médicas, resultó en la necesidad de proporcionar un nuevo método de preparación para el hidrolizado de gelatina con un contenido de endotoxinas más bajo.

Con este fin, la presente descripción proporciona un método para la preparación de un hidrolizado de gelatina que tiene un contenido de endotoxinas reducido, que comprende los siguientes pasos:

- a. incubar una solución de gelatina o hidrolizado de gelatina a una temperatura de 70 - 125 °C a un pH de 3.5 o menos durante un período de tiempo de al menos 15 minutos, y
- b. recuperar el hidrolizado de gelatina.

5 El término 'contenido de endotoxinas reducido' pretende significar que el nivel de endotoxinas del hidrolizado de gelatina del paso b., es significativamente más bajo que el del material de partida, es decir, la gelatina o el hidrolizado de gelatina antes de someterse al paso a. El nivel es preferiblemente al menos 10 veces más bajo, más preferiblemente al menos 100 veces más bajo, más preferiblemente al menos 500 veces más bajo o incluso 700 veces más bajo, más preferiblemente 1000 veces o incluso 5,000 veces, o incluso 10,000 veces más bajo. Como se verá en los ejemplos, se puede alcanzar un nivel 15 000 veces más bajo.

10 La temperatura está entre 70 y 125 °C, en donde se entiende que, a temperaturas superiores a 100 °C, el calentamiento se realiza bajo presión. Por lo tanto, la temperatura es preferiblemente entre 80 °C y 100 °C, más preferiblemente entre 90 y 100 °C.

15 El pH es de 3,5 o inferior, y el período de tiempo es preferiblemente de al menos 15 minutos. Será claro para el experto que una temperatura más alta permite un período de incubación más corto. El período de incubación se elige de tal manera que se alcance el contenido previsto de endotoxinas, al mismo tiempo que se proporciona un hidrolizado de gelatina con las propiedades previstas, como la distribución del peso molecular y el peso molecular promedio. El experto ajustará fácilmente los parámetros de temperatura, pH y tiempo para obtener el hidrolizado previsto con el contenido de endotoxinas bajo requerido.

20 Como se mostrará en los ejemplos, y entenderá fácilmente el experto, una temperatura más alta permite una reducción de pH menor y/o un período de tiempo más corto, y viceversa, es decir, un pH más bajo permite una temperatura más baja y/o un período de tiempo más corto. A la vista de lo anterior, la temperatura es preferiblemente entre 92 - 98 °C, más preferiblemente entre 94 - 96 °C, mientras que el pH es preferiblemente 3.0 o menos, más preferiblemente 2.7 o menos, más preferiblemente 2.5 o menos, aún más preferiblemente entre 1.8 - 2.2, y lo más preferiblemente aproximadamente 2.0. El término 'aproximadamente' pretende significar que el pH puede variar alrededor del valor de 2.0, en 0.5 o menos, es decir, entre 1.5 - 2.5, o preferiblemente 1.7 - 2.3, aún más preferiblemente 1.9 - 2.1. Sin embargo, se entiende que en los rangos de pH más bajos preferidos, por ejemplo, 2,5 o menos, una temperatura de 70 °C a 80 °C resultará en una eliminación atractiva de LPS, sin necesidad de calentar aún más. Se puede desear un calentamiento adicional para disminuir aún más el contenido de LPS. Por otro lado, en los rangos de temperatura preferidos más altos, por ejemplo, 90 °C o más, el pH puede elegirse en los límites superiores como se describe, por ejemplo, que tiene un valor de 3 - 3.5. Se puede desear una disminución adicional del pH para reducir aún más el contenido de LPS.

35 El período de tiempo es preferiblemente de 30 minutos o más. En ese período, la gelatina se hidroliza a dichas temperaturas altas y los niveles de endotoxinas serán atractivamente bajos. El período de tiempo es de 1 a 5 horas, preferiblemente de 1.5 - 3 horas, más preferiblemente de 2 - 2.5 horas.

40 En una modalidad muy atractiva, el método está libre de un paso de tratamiento enzimático. En los métodos actuales para la preparación de la hidrólisis de gelatina, a menudo se usan enzimas, las cuales es necesario inactivar y pueden requerir también una posterior purificación del hidrolizado, ya que cualquier material proteico extraño tal como estas enzimas puede causar una respuesta inmunitaria. Al usar condiciones inusuales de temperatura y pH, se descubrió que la hidrólisis ocurre sin necesidad de la participación de enzimas. Entonces, el producto es preferiblemente libre de enzimas.

45 Aunque el método puede comenzar con un hidrolizado de gelatina, se prefiere incubar una solución de gelatina en el paso a, que tenga un peso molecular de más de 70 kDa. Como las condiciones del método tienen poder de hidrólisis para la gelatina, no es necesario hidrolizar la gelatina en un paso previo.

50 El hidrolizado de gelatina en el paso b. preferiblemente tiene un peso molecular de 30 kDa o menos, preferiblemente de 20 kDa o menos, más preferiblemente de 10 kDa o menos, aún más preferiblemente de 5 kDa o menos, o incluso de 4 kDa o menos. Como se analizó anteriormente, el hidrolizado de gelatina no tiene poder de gelificación.

55 El hidrolizado de gelatina en el paso b. preferiblemente tiene un nivel de endotoxinas de 20 UE/g de hidrolizado de gelatina o menos, preferiblemente de 10 UE/g o menos, más preferiblemente de 5 UE/g o menos, aún más preferiblemente de 2 UE/g o menos, y lo más preferiblemente de 1 UE/g o menos. Estos valores se pueden obtener con materiales de partida de gelatina que tienen 10,000 - 15,000 EU/g de gelatina o más.

60 En el presente documento también se describe, pero no se reivindica, un hidrolizado de gelatina, obtenible mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores. Tal hidrolizado de gelatina preferiblemente tiene un peso molecular de 20 kDa o menos, preferiblemente de 15 kDa o menos, y un nivel de endotoxinas de 20 EU/g de hidrolizado de gelatina o menos, preferiblemente de 10 EU/g o menos, más preferiblemente de 5 EU/g o menos, aún más preferiblemente de 2 EU/g o menos, y lo más preferiblemente de 1 EU/g o menos, en particular medido de acuerdo con el método LAL descrito anteriormente.

La descripción se ilustrará aún más mediante los siguientes ejemplos y figuras.

Ejemplo 1

5 Efecto de la temperatura y el pH sobre los niveles de endotoxina en el hidrolizado de gelatina.

Las temperaturas variaron de 60 - 70 - 80 - 90 - 95 °C,
los valores de pH de 2 - 2.5 - 3 - '5' (sin cambios),
Se realizó la hidrólisis durante 3 horas.

10 Gelatina usada: #140P117162B1, gelatina de piel de cerdo tipo A, Rousselot, Gante, Bélgica (alta dureza, un peso molecular (MW) de 150 kDa, con un contenido de endotoxinas de -14000 EU/g).

15 Para cada temperatura/valor de pH de hidrólisis, se disolvieron 20 g de gelatina en 180 g de agua por calentamiento a 55 °C durante al menos 30 min para preparar 200 g de una solución de gelatina al 10 %. También es posible preparar una solución con una concentración de gelatina más baja o más alta.

Se tomaron muestras de 10 g y estas se colocaron en un baño de agua que tiene la temperatura de hidrólisis correcta hasta que la solución alcanzó esta temperatura (± 3 °C).

20 Para el análisis de pH, se usó una solución de H₂SO₄ 5 M; las cantidades necesarias de ácido por pH se determinaron con la ayuda de una curva de valoración.

Se tomaron muestras que se incubaron durante 0.1 - 0.5 - 1 - 1.5 - 2 - 3 h.

25 Al final del período de incubación previsto, se añadió NaOH 10 M para llevar el pH de la muestra a 4,9 con la ayuda de una curva de valoración, como se describe en la tabla 1, y las muestras se mantuvieron en el congelador a -20 °C hasta que se midió el nivel de endotoxinas.

Tabla 1: valores de valoración para la adición de NaOH

pH	NaOH 10 M [μL]
2 → ~4.9	19.3
2,5 → ~4.9	14.8
3 → ~4.9	11.8
4 → ~4.9	5.9

Para las mediciones del nivel de endotoxinas, las muestras se descongelaron en un baño de agua a 40 °C.

30 El peso molecular se ha medido de acuerdo al método descrito por Zhang, más arriba, y se muestra en las tablas 2 y 3.

Tabla 2: peso molecular a 95 °C a diferentes pH

Tiempo (h)	pH 2,0 y 95 °C	pH 2,5 y 95 °C	pH 2,7 y 95 °C
	MW (Da)	MW (Da)	MW (Da)
0	155	155	155
1	9.5	11.8	12.0
2	7.0	8.8	8.5
3	6.4	7.4	7.5
4	5.4	6.7	6.7

Tabla 3: peso molecular a pH 2,0 a diferentes temperaturas

Tiempo (h)	pH 2,0 y 80 °C	pH 2,0 y 90 °C	pH 2,0 y 95 °C
	MW (Da)	MW (Da)	MW (Da)
0	150	150	155
1	13.8	9.5	9.5
2	12.8	7.4	7.0
3	11.2	6.3	6.4
4	10.6	5.6	5.4

Los mismos experimentos se realizaron a un pH de 3, 4 y 5 a una temperatura de 121 °C en una autoclave durante 20 minutos.

Los resultados se presentan en las siguientes tablas 3 - y en las figuras 1-4.

35

ES 2 969 654 T3

Tabla 3: ejemplo comparativo a pH 5

Tiempo de hidrólisis [h]	Temperatura [°C]	EU/g
0	95	12017
0	80	12017
0	60	10834
3	60	7723
1	80	5421
2	80	7671
3	80	7371
1	90	7082
2	90	8000
3	90	7812
1	95	6520
2	95	6562
3	95	6323
0,33	121	4240

A un pH de 5, no se pudo observar una eliminación significativa de endotoxinas. Ver también la figura 1.

Tabla 4: niveles de endotoxinas a un pH de 2

Tiempo de hidrólisis [h]	Temperatura [°C]	EU/g
0,1	60	10000
1	60	5853
3	60	5285
0,1	70	9990
1	70	5084
3	70	825
0,1	80	10446
0,5	80	7911
1	80	4214
2	80	1875
3	80	731
1	90	751
2	90	67
3	90	13
0,1	95	6586
0,5	95	220
1	95	10
2	95	4
3	95	3
0,33	121	1

Ver también la figura 2. Se puede observar que a 90 y 95 °C, así como a 121 °C, se obtuvieron bajos niveles de endotoxinas a valores atractivos.

Tabla 5: Niveles de endotoxinas a un pH de 3

Tiempo de hidrólisis [h]	Temperatura [°C]	EU/g
0,1	70	8900
0,5	70	5148
1	70	5708
3	70	5222
0,1	80	7359
0,5	80	5693
1	80	5024
3	80	1858
0,1	95	5924
0,5	95	1032
1	95	92

ES 2 969 654 T3

3	95	7
0,33	121	3

Ver también la figura 3. Nuevamente, a un pH de 3 y una temperatura superior a 90 °C, tal como 95 °C, se observan los niveles de endotoxinas previstos.

Tabla 6: Niveles de endotoxinas a un pH de 2,5 y una temperatura de 95 °

Tiempo de hidrólisis [h]	EU/g	MW[kDa]
0	13919	150
0,25	7960	
1	14,5	4534
3	<4	7.4
4	<4	6.7
4.5	<4	6.5
5	<4	6.3
6	<4	6.0
7	<4	5.7

De la tabla 6, los datos también se muestran en la figura 4, se puede observar que la gelatina se hidroliza hasta un peso molecular por debajo de 4000 Da, mientras que el nivel de endotoxinas está por debajo de 10 EU/g después de más de una hora de tiempo de incubación.

5

Además de los datos anteriores a 121 °C a valores de pH de 2, 3 y 5 y un período de incubación de 20 minutos, también se realizó una medición a pH 4, lo que resultó en un valor de 164 EU/g. Los datos se resumen en la figura 5, que muestra un resultado atractivo a un valor de pH de 3.

10

Se obtuvieron resultados similares para la gelatina tipo B.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Método para la preparación de un hidrolizado de gelatina que tiene un contenido de endotoxinas reducido, que comprende los pasos de:
- a. incubar una solución de gelatina o hidrolizado de gelatina a una temperatura de 70 - 125 °C a un pH de 3.5 o menos durante un período de tiempo de al menos 15 minutos, y
 - b. recuperar el hidrolizado de gelatina.
- 10
2. Método de la reivindicación 1, en donde la temperatura está entre 90 - 100 °C.
3. Método de la reivindicación 1, en donde la temperatura está entre 92 - 98 °C, preferiblemente entre 94 - 96 °C.
- 15
4. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el pH es 2.7 o menos.
5. Método de la reivindicación 4, en donde el pH es 3,0 o menos, preferiblemente 2.5 o menos, preferiblemente entre 1.8 - 2.2, y lo más preferiblemente aproximadamente 2.0.
- 20
6. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el período de tiempo es de 30 minutos o más.
7. Método de la reivindicación 6, en donde el período de tiempo es de 1 - 5 horas, preferiblemente de 1.5 - 3 horas, más preferiblemente de 2 - 2.5 h.
- 25
8. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está libre de un paso de tratamiento enzimático.
9. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde en el paso a. se incuba una solución de gelatina, la gelatina tiene un peso molecular superior a 70 kDa.
- 30
10. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el hidrolizado de gelatina en el paso b. tiene un peso molecular de 30 kDa o menos, preferiblemente de 20 kDa o menos, más preferiblemente de 10 kDa o menos, incluso más preferiblemente de 5 kDa o menos.
- 35
11. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el hidrolizado de gelatina en el paso b. tiene un nivel de endotoxinas de 20 UE/g de hidrolizado de gelatina o menos, preferiblemente de 10 UE/g o menos, más preferiblemente de 5 UE/g o menos, aún más preferiblemente de 2 UE/g o menos, y lo más preferiblemente de 1 UE/g o menos.

40

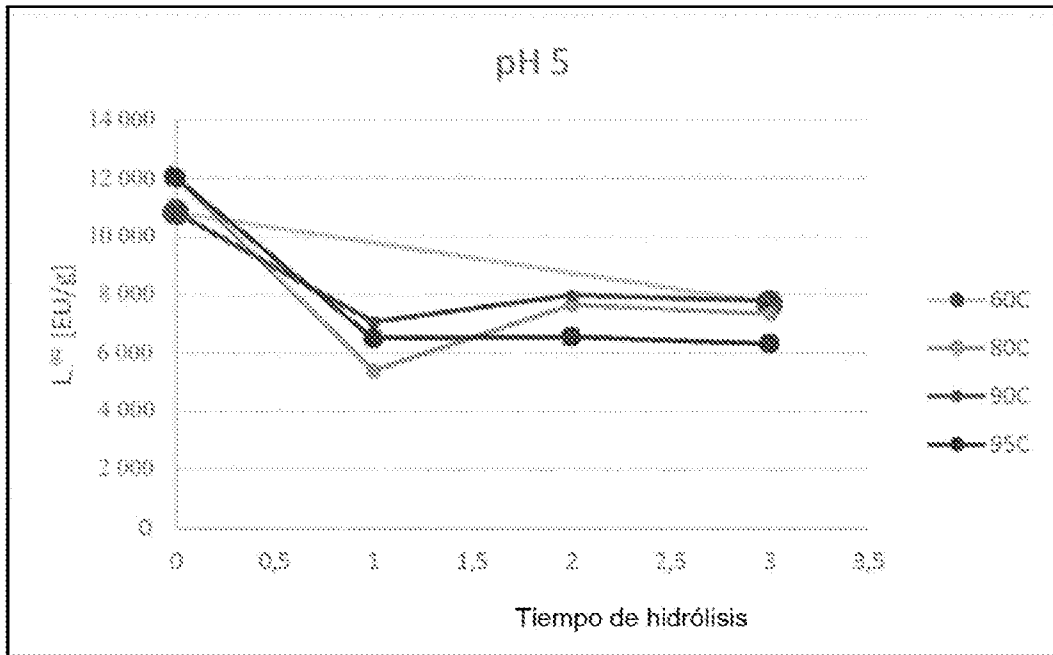


Figura 1

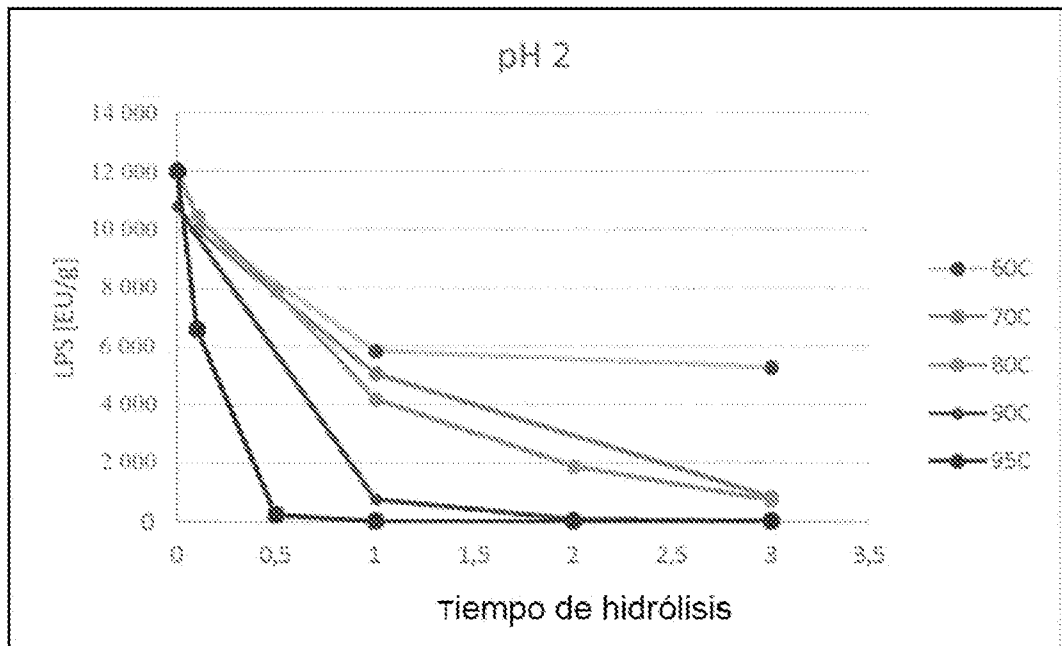


Figura 2

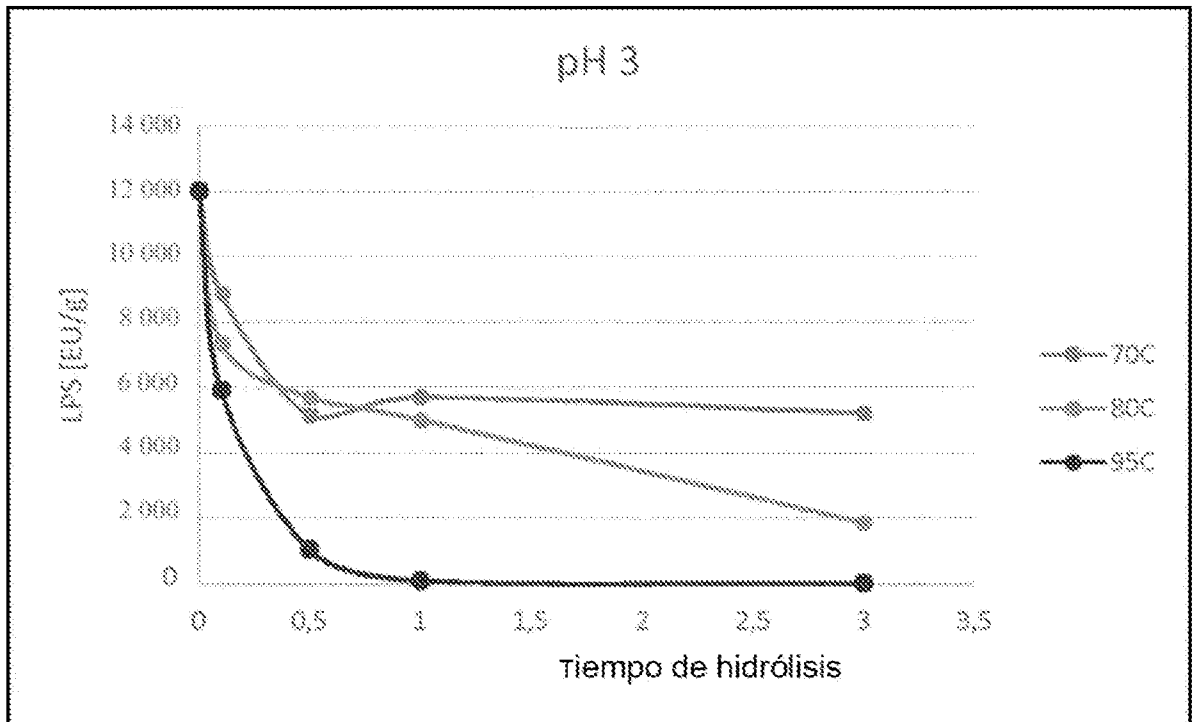


Figura 3

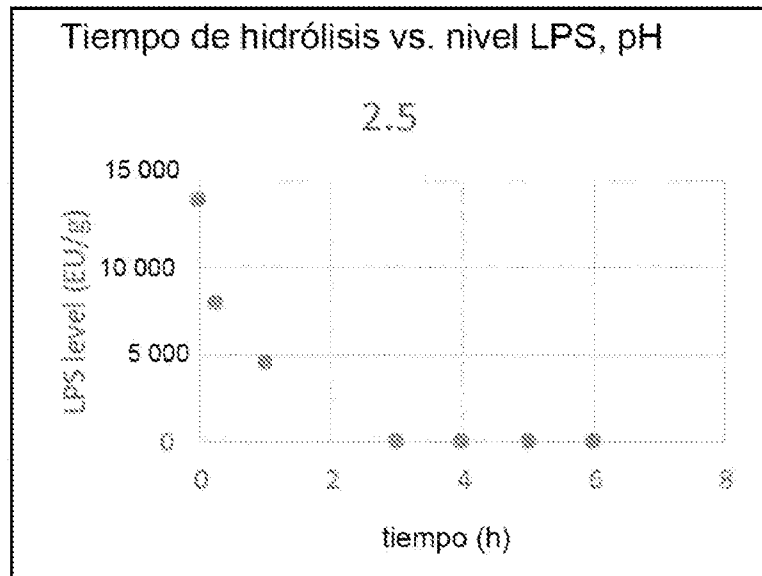


Figura 4

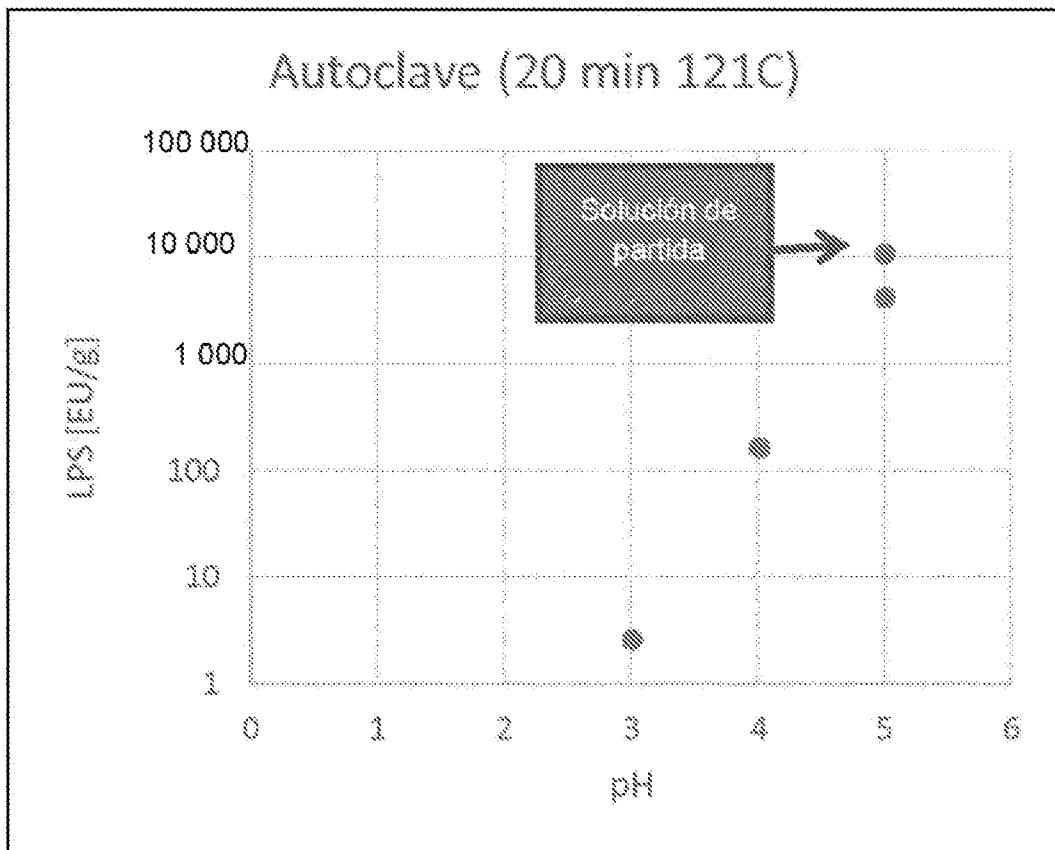


Figura 5