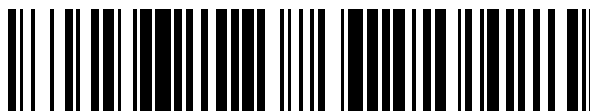


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 655**

51 Int. Cl.:
A23L 1/302 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01)
A61K 31/205 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06793668 .2**
96 Fecha de presentación: **20.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1940251**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2008**

54 Título: **Suplemento dietético que proporciona energía a los músculos esqueléticos y protege el tracto cardiovascular**

30 Prioridad:
20.10.2005 US 253806

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2012

73 Titular/es:
**SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE
RIUNITE S.P.A.
VIALE SHAKESPEARE 47
00144 ROMA, IT**

72 Inventor/es:
GAETANI, Franco

74 Agente/Representante:
Campello Estebaranz, Reyes

ES 2 378 655 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

Suplemento dietético que proporciona energía a los músculos esqueléticos y protege el tracto cardiovascular.

5 La presente invención se refiere a un suplemento dietético que proporciona energía orientado particularmente para facilitar la adaptación de los músculos esqueléticos y el cardiaco de individuos que se dedican a actividad física y/o recreativa que puede ser particularmente intensa y prolongada. Cualquier persona implicada en actividades deportivas, sean de tipo profesional o de tipo aficionado, desea conseguir lo más pronto posible y mantener durante el mayor tiempo posible el grado máximo de adaptación de los músculos esqueléticos a la capacidad de mantener periodos prolongados de actividad física intensa.

10 La búsqueda de la forma física óptima puede favorecer el uso inadecuado de fármacos, particularmente esteroides. Es bien sabido que tales fármacos pueden aumentar la síntesis de proteínas y reforzar por consiguiente el crecimiento de la masa muscular en mayor proporción que la que puede alcanzarse por el entrenamiento y la dieta. El uso de tales fármacos, sin embargo, es indudablemente perjudicial para la salud además de ser ilegal cuando se practica en deporte profesional.

15 Por consiguiente, es obvio que la única manera correcta de conseguir la meta arriba mencionada consiste en someterse a programas de entrenamiento de larga duración reforzados por dietas adecuadas complementadas convenientemente.

Por ello, en fecha más o menos reciente, se han propuesto diversos suplementos dietéticos orientados a reforzar las dietas de los individuos implicados en actividad física intensa sea al nivel profesional o al aficionado.

20 La gran mayoría de estos suplementos dedican atención particular al metabolismo de la musculatura esquelética que requiere una extensa gama de nutrientes para síntesis de proteínas, incluyendo principalmente aminoácidos. De hecho, dado que prácticamente la totalidad de los aminoácidos, sean esenciales o no esenciales, son sustratos requeridos por las células musculares para dicha síntesis, se han comercializado recientemente desde hace algún tiempo suplementos dietéticos que contienen mixturas de aminoácidos en diversas ratios peso a peso en combinación con otros ingredientes activos y nutrientes (véanse, por ejemplo, las Patentes US 4.687.782 y 5.292.538).

Con otros suplementos dietéticos, por otra parte, la atención está enfocada más bien a la producción de energía y por consiguiente de ATP. Los ingredientes que caracterizan estos suplementos son para ello principalmente la coenzima Q₁₀ y la creatina.

30 La coenzima Q₁₀ juega un papel fundamental en el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial, que es necesaria para las transformaciones energéticas requeridas para la producción de ATP.

La función fisiológica de la creatina, que es biosintetizada parcialmente en el hígado y los riñones e ingerida parcialmente con la dieta, es también extremadamente importante en términos de energía: en el músculo, pero también en el cerebro, el hígado y los riñones, la creatina absorbe reversiblemente el grupo fosfórico del ATP y juega un papel como reserva de radicales fosfóricos ricos en energía.

35 La importancia de esta reacción proviene del hecho de que el ATP no puede acumularse en los tejidos por encima de un límite muy moderado. Es la fosfocreatina presente en los tejidos en cantidades aproximadamente cinco veces mayores que el ATP, la que asegura su suministro. De hecho, incluso después de ejercicio físico sólo moderado la fosfocreatina disminuye en los músculos esqueléticos en una proporción mucho más acusada que el ATP, demostrando que la fosfocreatina refosforila el ATP, a medida que se desfosforila el ATP. Cuando la tasa de producción metabólica de ATP excede de su tasa de utilización, se forma fosfocreatina. La fosfocreatina constituye por tanto un almacén de energía utilizable inmediatamente adecuada para las necesidades de energía "tampón" por encima de la tasa de síntesis de ATP en los procesos metabólicos fosforilantes.

40 En resumen, con los suplementos dietéticos existentes hay cierta tendencia, por una parte, a aumentar la masa muscular y, por otra parte, a constituir reservas de energía que pongan a disposición inmediatamente energía "consumible" cuando la intensidad del esfuerzo físico lo requiere.

45 La mejora muscular y la disponibilidad incrementada de energía favorecidas por estos suplementos alimenticios conocidos pueden, sin embargo, causar efectos secundarios incluso graves, particularmente en individuos que, dado que no practican profesionalmente el deporte y por consiguiente no están sometidos periódicamente a chequeos concienzudos, pueden verse inducidos a implicarse en ejercicios físicos que exceden de sus límites fisiológicos de resistencia sin que los mismos perciban necesariamente esta situación.

Tales individuos constituyen la mayoría de los usuarios de suplementos dietéticos y una proporción considerable de ellos son individuos que ya no son jóvenes o pueden ser claramente de edad avanzada, los cuales se someten muy raramente a chequeos médicos para averiguar su aptitud para la actividad física a ejercer y para establecer los límites de intensidad y esfuerzo más allá de los cuales es peligroso implicarse.

Dado que es particularmente el sistema cardiovascular el que se ve sometido a estrés más acusada por cualquier tipo de actividad física o deportiva, puede quedar poca duda en cuanto al riesgo obvio al que se exponen a sí mismos estos usuarios, en el sentido de que su propensión a mantener cargas de fatiga y estrés físico desproporcionados para el estado y la integridad del aparato cardiovascular pueden incrementarse considerablemente por el consumo de tales suplementos energéticos.

Existe, por consiguiente, una necesidad percibida de un suplemento dietético que, por una parte, tenga un efecto energético y reforzante sobre los músculos esqueléticos y, por otra, ejerza al mismo tiempo un efecto tónico protector sobre el aparato cardiovascular del usuario.

En el documento US 5.889.062, una formulación tópica para el tratamiento del envejecimiento de la piel comprende coenzima Q₁₀ como ingrediente relevante. Opcionalmente, esta formulación puede contener L-carnitina. Los suplementos nutricionales de acuerdo con US 6.479.069 B1 y WO 01/21208 A1 contienen L-carnitina o acetil L-carnitina, coenzima Q₁₀, riboflavina y ácido pantoténico como componentes esenciales. La nicotinamida se utiliza como ingrediente esencial además de propionil L-carnitina, coenzima Q₁₀, riboflavina y ácido pantoténico en los suplementos dietéticos de WO 01/74361 A1 y US 2003/0129177 A1 y una coformulación publicada en un artículo de revista (R. Vargiu et al., Physiology & Behavior vol. 76, pp. 257-263, 2002).

La finalidad de la presente invención es proporcionar precisamente un suplemento dietético de este tipo.

Un objeto de la presente invención es, por tanto, un suplemento dietético dotado de un efecto reforzante potente y energético a la musculatura esquelética y, al mismo tiempo, un efecto protector tónico al aparato cardiovascular de los individuos que se dedican a actividades deportivas y/o recreativas que pueden requerir esfuerzo físico intenso y prolongado, constituido por los componentes caracterizantes y opcionales en combinación o incluidos en paquetes separados de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

La ratio peso a peso de los componentes (a):(b):(c):(d) varía desde 10:0,04:0,08:0,4 a 1:4:4:20 y preferiblemente desde 10:2:2:2 a 1:1:1:5.

La actividad de las "carnitinas" en general, y de la propionil L-carnitina en particular, sobre el metabolismo de los lípidos es bien conocida, como lo es su acción anti-ateroesclerótica y su acción sobre los trastornos del metabolismo de los lípidos.

La propionil L-carnitina, sin embargo, difiere de las otras "carnitinas" en su actividad cardiovascular específica, a pesar de participar, al igual que las otras "carnitinas", sobre todo al nivel mitocondrial, en el importante papel metabólico relacionado con la oxidación en β de los ácidos grasos y la síntesis del ATP.

La propionil L-carnitina toma parte en todas las actividades metabólicas características de las "carnitinas", pero, al contrario que las otras, presenta una actividad más pronunciada al nivel vascular, y particularmente al nivel de la circulación periférica, constituyendo así en sí misma un agente terapéutico valioso para la prevención y el tratamiento de diversas vasculopatías periféricas. La propionil L-carnitina es también superior a las otras carnitinas en condiciones en las cuales las otras carnitinas son incapaces de actuar, y esta característica particular está relacionada con su intervención metabólica más directa en los procesos de utilización de la energía al nivel mitocondrial y con la presencia del grupo propionilo que distingue su efecto farmacológico del de otras moléculas similares en tal proporción que hace de ella una entidad química en sí misma, con propiedades superiores y diferentes a las de las otras carnitinas.

La propionil L-carnitina es un componente existente naturalmente del conjunto de las carnitinas y se sintetiza por medio de la carnitina acetil-transferasa a partir de la propionil-coenzima A.

Su administración a individuos humanos conduce a un aumento en las concentraciones plasmáticas de propionil L-carnitina, lo cual causa a su vez el aumento en las concentraciones plasmáticas de L-carnitina que regulan su contenido en las células con un aumento en su efecto oxidante sobre los ácidos grasos y la utilización de glucosa. Adicionalmente, la carnitina-transferasa muscular posee una mayor afinidad para la propionil L-carnitina que para L-carnitina, y por consiguiente la propionil L-carnitina posee un mayor grado de especificidad para la musculatura cardíaca y esquelética. Al transportar el grupo propionilo, la propionil L-carnitina aumenta la absorción de este componente por las células musculares, particularmente las del miocardio. Esto puede ser de importancia particular, dado que el propionato puede ser utilizado por las mitocondrias como sustrato anaplerótico y suministrar energía en condiciones anaerobias. Debe recordarse que el propionato no puede ser utilizado solo debido a sus efectos secundarios.

Aparte de estos efectos metabólicos, debe recordarse también que, debido a su cadena alcanóilo, la propionil L-carnitina ejerce una acción farmacológica específica por activar la vasodilatación periférica y el inotropismo del miocardio en condiciones en las cuales las otras carnitinas son inactivas.

Además de propionil L-carnitina, el suplemento dietético puede comprender adicionalmente una "carnitina" seleccionada del grupo constituido por L-carnitina, acetil L-carnitina, valeril L-carnitina, isovaleril L-carnitina y butiril L-carnitina o sus sales farmacológicamente aceptables.

Lo que se entiende por una sal farmacológicamente aceptable de L-carnitina o de una alcanoil L-carnitina es cualquier sal de éstas con un ácido que no da lugar a efectos tóxicos o secundarios indeseables. Estos ácidos son bien conocidos por los farmacólogos y los expertos en tecnología farmacéutica.

- 5 Ejemplos de tales sales, pero sin carácter exclusivo de las mismas en absoluto, son los siguientes: cloruro; bromuro; yoduro; aspartato, aspartato ácido; citrato, citrato ácido; tartrato; fosfato, fosfato ácido; fumarato, fumarato ácido; glicerofosfato; glucosa-fosfato; lactato; maleato; maleato ácido; mucato; orotato; oxalato, oxalato ácido; sulfato, sulfato ácido; tricloroacetato; trifluoroacetato y metano-sulfonato.

Una lista de ácidos farmacológicamente aceptables aprobados por la FDA se proporciona en Int. J. Pharm. 33, 1986, 201-217.

- 10 Para la preparación de formas de administración sólidas, tales como, por ejemplo, tabletas, píldoras, cápsulas y granulados, se prefiere el uso de sales no higroscópicas. Las sales no higroscópicas preferidas de propionil L-carnitina y de cualesquiera otras alcanoil L-carnitinas presentes son los mucatos (o galactaratos), descritos en la Patente US 5.952.379.

- 15 Siempre que, en las formas de administración sólidas arriba mencionadas, esté presente también L-carnitina, la sal preferida de esta carnitina es el fumarato ácido descrito en la Patente US 4.602.039.

Además de sus características de estabilidad y ausencia de higroscopicidad, el fumarato de L-carnitina ejerce una doble acción protectora con respecto al metabolismo de las proteínas: por un aumento directo en el metabolismo intermedio, estimula indirectamente la biosíntesis de proteínas y, como resultado de la movilización de los ácidos grasos, induce un efecto economizador/protector sobre los componentes proteínicos musculares.

- 20 El suplemento dietético de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente uno o más de los componentes siguientes:

- f) un aminoácido seleccionado del grupo constituido por valina, leucina e isoleucina o mixturas de los mismos;
- g) una creatina seleccionada del grupo constituido por creatina y fosfocreatina o mixturas de las mismas.

Una realización preferida del suplemento dietético de la presente invención en forma de dosis unitaria contiene:

propionil L-carnitina	desde 50 mg	a	2000 mg
coenzima Q ₁₀	desde 5 mg	a	200 mg
riboflavina	desde 5 mg	a	200 mg
ácido pantoténico	desde 10 mg	a	1000 mg

25

Por ejemplo, una formulación adecuada para tabletas es la siguiente:

propionil L-carnitina	250 mg
coenzima Q ₁₀	20 mg
riboflavina	20 mg
ácido pantoténico	20 mg

- 30 El suplemento puede comprender adicionalmente sales minerales, tales como, por ejemplo, citrato disódico, fosfato monopotásico, lactato de calcio y taurato de magnesio. El suplemento dietético de la presente invención es adecuado para administración oral. El suplemento, incluso cuando comprende los aminoácidos arriba mencionados, no debe utilizarse como fuente individual o principal de nutrición sobre una base día a día.

La parte complementaria de la dieta estará constituida, por tanto, por aminoácidos apropiados, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales.

- 35 La cantidad de suplemento dietético ingerida diariamente puede variar dentro de límites amplios, dependiendo, por ejemplo, de la edad y el peso del individuo, o de la intensidad y complejidad del programa de entrenamiento o la actividad física a la que se dedique el individuo.

- 40 El potente efecto energético sobre la musculatura esquelética y, al mismo tiempo, el efecto protector sobre el sistema cardiovascular que se consigue con el programa dietético de la presente invención ha sido demostrado por varios tests farmacológicos (algunos de los cuales se describen más adelante en esta memoria) seleccionados de tal modo que son fuertemente predictivos para el uso práctico del suplemento en el campo humano. En estos tests, se administró a los animales a los que se aportó una composición de acuerdo con la invención la formulación de tabletas descrita previamente a la dosis de 50 mg/kg/día durante varias semanas.

Ejemplo 1

- 45 Mejora de la mecánica cardiaca por una composición compuesta de Propionil L-carnitina, Coenzima Q₁₀, Riboflavina y Ácido pantoténico en la rata.

Se estudiaron los efectos mecánicos del tratamiento de larga duración (7 semanas) con una coformulación de Propionil L-carnitina, Coenzima Q₁₀, Riboflavina y Ácido pantoténico (esta composición se designará en adelante como "HS122.1A"), sobre el músculo papilar ventricular izquierdo aislado de la rata (LVPM).

5 La curva longitud-tensión activa para LVPM tratado con HS122.1A era elevada, con tensión máxima (P₀) a la longitud óptima, 57% mayor que la de los músculos de control. El aporte de el suplemento no alteraba la longitud-tensión pasiva, el tiempo hasta la tensión pico (TPT), o el tiempo de semi-relajación (RT₅₀); sin embargo, la tasa máxima de desarrollo de tensión (+ dT/dt) y la tasa máxima de caída de tensión -dT/dt se incrementaban 47% (p < 0,001) y 54% (p < 0,001) respectivamente por el aporte de el suplemento.

10 A las poscargas mínimas (0,2 P₀) la cantidad de acortamiento de LVPM en las ratas que recibieron el suplemento HS122.1A se había incrementado 47% comparada con las ratas de control.

15 La cantidad máxima de trabajo ($1,24 \pm 0,16 \mu\text{J} \cdot \text{CSA}^{-1} \cdot \text{longitud del músculo}^{-1}$) era dos veces mayor que la de los animales de control ($0,58 \pm 0,21 \mu\text{J} \cdot \text{CSA}^{-1} \cdot \text{longitud del músculo}^{-1}$). La velocidad de acortamiento era mayor para los músculos de las ratas que recibieron HS122.1A que para las ratas de control para todas las cargas testadas. La velocidad máxima de acortamiento (V_{max}) calculada con las ecuaciones de Hill, de $1,52 \pm 0,14 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{longitud del músculo}^{-1}$ era significativamente mayor (p < 0,05) que la de $1,01 \pm 0,21 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{longitud del músculo}^{-1}$ para el músculo de control. Se encontró que los músculos de las ratas que recibieron el suplemento desarrollaban una tensión significativamente mayor (p < 0,05) antes que la velocidad de acortamiento se redujera a cero, con un promedio de $36,76 \pm 8,65 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ comparada con $23,35 \pm 5,61 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2}$ para LVPM de las ratas de control. Por lo que respecta a la potencia obtenida como el producto entre la velocidad de acortamiento y las cargas levantadas, el valor máximo ($9,24 \pm 2,22 \mu\text{W} \cdot \text{CSA}^{-1} \cdot \text{longitud del músculo}^{-1}$) era dos veces mayor en las ratas que recibieron suplemento HS122.1A (p < 0,05) que en las ratas de control ($4,44 \pm 1,02 \mu\text{W} \cdot \text{CSA}^{-1} \cdot \text{longitud del músculo}^{-1}$).

En conclusión, el aporte del suplemento HS122.1A daba como resultado funciones cardiacas y contractilidad mejoradas en la rata.

25 Se utilizaron 20 ratas Wistar macho obtenidas de Charles River, Italia. Los animales se mantuvieron en un alojamiento para animales, en condiciones ambientales controladas (ciclo luz-oscuridad de 12 horas, 22-24°C, 40-50% de humedad) y recibieron alimento y agua a discreción.

30 Los animales se asignaron aleatoriamente para recibir cada día, por sonda esofágica, durante 7 semanas, o bien un tratamiento en blanco constituido por carboximetil-celulosa (CMC) o HS122.1A, una formulación que contenía (mg/kg/d en CMC): propionil-L-carnitina (35,02), coenzima Q₁₀ (2,77), riboflavina (2,77), y ácido pantoténico (2,77). Diez ratas recibieron HS122.1A y 10 ratas recibieron CMC. Comúnmente se utiliza CMC para facilitar una suspensión de sustancias pulverizadas o insolubles.

Determinación del peso corporal.

35 Todos los animales se pesaron diariamente en una balanza Mettler (Suiza), exacta hasta $\pm 1 \text{ g}$, a fin de establecer la cantidad de HS122.1A o vehículo a administrar a cada rata.

Preparación y montaje del músculo.

40 Después del periodo de aporte del suplemento (7 días), los animales se anestesiaron por medio de éter y se realizó seguidamente la eutanasia por extirpación rápida del corazón. El corazón se puso inicialmente en solución de Krebs. Bajo el estereomicroscopio (16x, Zeiss) se extirpó el músculo papilar izquierdo con una pequeña porción del ventrículo. El músculo papilar se montó entre dos pequeños clips metálicos (Fine Science Tools, Vancouver, Canadá) y se colocó verticalmente en una cámara Perspex encamisada (10 ml) que contenía solución de Krebs, con el extremo inferior (el extremo de la pared ventricular) unido a un transductor de fuerza (Mod.Wpl Fort 10, 2200 $\mu\text{N} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, ADInstrument, Pty Ltd. Australia) que estaba montado en la cámara. El extremo superior se conectó por vía de un alambre de acero cuidadosamente rectificado a una palanca isotónica de un transductor de desplazamiento lineal (momento de inercia $35 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$, par de torsión de rotura $< 0,1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1}$, Basile Comerio, Italia). El brazo de la palanca del transductor (longitud fulcro-anillo orgánico: 10 cm, intervalo operativo: $\pm 15\%$) estaba hecho de una pared delgada de tubo cónico de fibra de carbono. La carga del brazo de la palanca era proporcionada por un contrapeso cilíndrico de aleación de wolframio que se movía a lo largo de una escala produciendo una variación de carga de 0,01 g/paso. Cada experimento se realizó con dos músculos de ratas de control y que recibieron el suplemento HS122.1A respectivamente, que se contraían simultáneamente en dos baños de órganos. Inicialmente se dejó que cada preparación se contrajera isotónicamente a una frecuencia de 0,06 Hz bajo una carga de 10 mN mientras se hallaba en solución. Este periodo de equilibración inicial duró 40 a 60 minutos y se consideró completo cuando se había estabilizado la eficiencia mecánica.

Registros longitud-tensión.

55 Después del periodo de equilibración, los músculos se dispusieron para contraerse isométricamente y se estimularon a una frecuencia de 0,06 Hz. Se realizó una determinación preliminar de la longitud óptima para la

producción de la tensión máxima desarrollada (L_{max}). Las longitudes del músculo se alteraron por pasos incrementales de 0,1 mm y se dejó que los músculos alcanzaran el equilibrio durante un periodo de aproximadamente 5 minutos a cada nueva longitud. La longitud óptima (L_{max}) se determinó como el punto de máxima producción de tensión desarrollada durante esta secuencia de longitudes musculares crecientes. Los músculos se

5 estiraron a continuación hasta $1,06 L_{max}$ y se redujeron a la longitud seleccionada por decrementos de $0,02 L_{max}$ desde $1,06$ a $0,94 L_{max}$. Con objeto de minimizar los efectos de estrés-relajación, se dejó que los músculos alcanzaran el equilibrio durante un periodo de 5 minutos para cada nueva longitud. Las propiedades mecánicas de esta preparación se mantienen relativamente estables durante muchas horas y se obtuvieron curvas longitud-tensión reproducibles.

10 *Registros fuerza-velocidad.*

Una vez completados los registros isométricos y después de un periodo de equilibración subsiguiente de 20-30 minutos, se realizaron experimentos isotónicos. La respuesta de acortamiento a la estimulación eléctrica se registró por la técnica isotónica clásica de la poscarga. Inicialmente, se aplicó al músculo una precarga correspondiente a la tensión en reposo (RT) registrada a L_{max} (véase la Tabla 1). Las preparaciones se sometieron a poscarga por

15 incrementos progresivos de 20%, 40%, 60%, 80 y 100% Po. Para cualquier carga, se registraron simultáneamente la tensión desarrollada y el acortamiento.

TABLA 1 (Pesos del cuerpo y de los órganos)

	Control	Tratado
Peso corporal inicial (g)	161,2 ± 14,5	175,2 ± 10,1
Peso corporal final (g)	339,0 ± 20,2	338,9 ± 27,9
Peso del corazón (mg)	967,3 ± 99,8	930,7 ± 80,7
Peso de LVMB (mg)	12,4 ± 3,2	12,1 ± 1,9

Los valores son valores medios ± desviación estándar. En los grupos de control y tratado n = 10 animales.

Estimulación eléctrica.

20 Se suministraron estímulos eléctricos por medio de electrodos de platino paralelos que suministraban pulsos de onda cuadrada de 5 ms a intensidades de corriente (8-14 mA) que eran 10% mayores que el mínimo necesario para producir respuesta mecánica. Se suministró a los electrodos una estimulación transversal del campo eléctrico por medio de una corriente constante de alta potencia (reforzador de pulsos Multiplexing, Basile, Comerio, Italia) conectado a un estimulador PowerLab (ADInstruments, Pty Ltd Australia). Se registraron las tensiones de sacudida

25 isométricas e isotónicas a una frecuencia de 0,06 Hz.

Soluciones.

La solución de Krebs tenía la composición siguiente (mM): NaCl 123, KCl 6,0, CaCl₂ 2,50, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 20, KH₂PO₄ 1,2. Glucosa 11. La solución se aireó continuamente con una mixtura de 95% O₂ y 5% CO₂ durante la disección de los músculos así como durante el experimento real.

30 *Temperatura.*

La temperatura se mantuvo constante a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ a lo largo del experimento por circulación de agua desde un depósito termostatzado (Basile, Comerio, Italia) a través de la camisa alrededor de la cámara del músculo.

Sistema de registro.

35 Se registraron las señales experimentales isométricas e isotónicas y se analizaron mediante una computadora (Pentium IV Pro 512 MB ram; el gráfico de software V.4.1.2) equipada con un programa convertidor analógico a digital (PowerLab ADInstruments, Pty Ltd, Australia).

Determinación de la curva longitud-tensión.

40 Para cada incremento de longitud se midieron las tensiones residual y desarrollada. La tensión residual se midió a partir de la tensión de la línea base (determinada para incremento mínimo en la tensión registrada: 0,01-0,025 mN) en el periodo de reposo inmediatamente antes del cambio de longitud siguiente. La tensión total se midió entre la tensión pico desarrollada y la tensión de la línea base, y la tensión desarrollada se midió como la diferencia entre las tensiones total y residual.

45 Los valores de tensión se normalizaron para el área de sección transversal (CSA). El área de sección transversal de cada músculo se calculó a partir de la ecuación $A=M/\rho L$, donde M es la masa (g), ρ es la densidad (g/ml) y es numéricamente igual a la densidad relativa, y L es la longitud (mm). La densidad relativa del tejido bañado en solución Krebs-bicarbonato, como se determinó por la técnica picnométrica, era 1,056. La longitud del músculo se midió para L_{max} .

Determinaciones de las curvas fuerza-velocidad y potencia-carga.

Un primer paso de proceso en el análisis de las ondas de acortamiento experimentales era la supresión del ruido, es decir, la estimación de la señal desconocida de interés a partir de los datos con ruido disponibles. Los datos sin ruido se obtuvieron por la Transformada Daubechies Discrete Wavelet. Para cada poscarga aplicada, se tomó la velocidad de acortamiento como pico de la velocidad obtenida por cálculo del valor medio de las velocidades máximas alcanzadas por la onda de acortamiento. La relación entre la velocidad de acortamiento y la carga se determinó por representación gráfica de la tensión desarrollada frente a la velocidad pico de acortamiento para cada poscarga.

La velocidad de acortamiento se normalizó para la longitud del músculo y se expresó como $\text{mm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{longitud del músculo}^{-1}$.

Se obtuvieron curvas potencia-carga multiplicando la fuerza por la velocidad para cada poscarga aplicada.

Análisis estadístico.

Con objeto de comprobar las diferencias entre los grupos a los que se aportó el suplemento y los de control, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y se consideró significativa $p < 0,05$. Las determinaciones longitud-tensión, acortamiento, velocidad de acortamiento, trabajo y potencia se representaron gráficamente en términos de valores medios \pm S.D.

Resultados.

Las características generales de los animales y el LVPM de ratas que recibieron el suplemento HS122.1A y ratas de control se ven en la Tabla I.

Las medidas de peso del corazón, peso corporal, y ratio de peso de corazón a peso corporal entre los grupos no acusaban diferencia alguna.

No se encontró diferencia significativa alguna cuando se compararon la longitud del músculo, el peso del músculo y el área de la sección transversal resultante entre las ratas que recibieron el suplemento HS122.1A y ratas de control.

Medidas isométricas. Determinaciones longitud-tensión.

Los efectos de HS122.1A sobre el mecanismo Frank-Starling del músculo papilar de la rata se muestran en las trazas experimentales representativas y las relaciones longitud-tensión en LVPM de ratas a las que se había administrado el suplemento HS122.1A y ratas de control consignadas en Fig. 1. Las trazas experimentales representativas (Fig. 1 A-B) (en reposo e inducidas eléctricamente) consignan la tensión de sacudida activa típica registrada para decrementos de longitud seleccionados ($0,02 L_{\text{max}}$) desde $1,06$ a $0,94 L_{\text{max}}$ en dos LVPMs de ratas que recibieron el suplemento HS122.1A (Fig. 1A) y ratas de control (Fig. 1B). La longitud del músculo se redujo progresivamente a la longitud seleccionada por decrementos de $0,02 L_{\text{max}}$ desde $1,06$ a $0,94 L_{\text{max}}$. Se presenta la relación longitud-tensión (Fig. 1 C-D) para LVPMs de ratas que recibieron el suplemento HS122.1A (Fig. 1C) y ratas de control (Fig. 1D) (los valores son valores medios \pm S.D. de 10 experimentos). Como se representa en el diagrama de Fig. 1C, la longitud-tensión activa de los músculos que recibieron el suplemento aumentaba con la fuerza pico (P_0) generada a L_{max} $36,76 \pm 8,65 \text{ mN} \cdot \text{mm}^2$ que resultaba 57% mayor comparada con ratas de control ($23,35 \pm 5,61 \text{ mN} \cdot \text{mm}^2$) ($p < 0,001$) (Fig. 1D). El aporte del suplemento no alteraba significativamente la longitud-tensión pasiva de los LVPMs; sin embargo, las curvas de tensión totales eran mayores ($p < 0,05$) para las ratas que recibieron el suplemento en todo el intervalo de longitudes de músculo estudiado.

Se observó un efecto positivo inotrópico de HS122.1A en los índices de temporización isométricos. Se obtuvieron parámetros mecánicos en contracciones isométricas en el LVPM de las ratas que recibieron HS122.1A (A) y ratas de control (B) y se muestran en Fig. 2 (los valores se normalizaron para el área de la sección transversal y se representan como valores medios \pm S.D. de 10 experimentos). Como se consigna en Fig. 2, la tasa máxima de desarrollo de tensión ($+dT/dt$) y la tasa máxima de caída de tensión ($-dT/dt$) resultaban aumentadas 47% ($p < 0,001$) y 54% ($p < 0,001$) respectivamente en las ratas que recibieron el suplemento (Fig. 2A) comparadas con ratas de control (Fig. 2B). El aporte del suplemento no cambiaba el tiempo hasta el pico (TPT), y el tiempo de semi-relajación (RT_{50}) (periodo de tiempo necesario hasta que la tensión pico desarrollada disminuye un 50% de su valor máximo).

Medidas isotónicas. Acortamiento, trabajo, velocidad de acortamiento y determinación de la potencia

Se determinaron el acortamiento, el trabajo, la velocidad de acortamiento y la potencia sobre LVPMs que recibieron el suplemento HS122.1A y LVPMs de control (Fig. 3; el acortamiento y la velocidad de acortamiento se normalizaron para la longitud del músculo. El trabajo y la potencia se normalizaron para la longitud del músculo y el área de la sección transversal (CSA). Cada valor representaba el valor medio \pm S.D. de 10 músculos.). Se encontró también un efecto positivo inotrópico sobre los parámetros isotónicos registrados en LVPMs de ratas que recibieron HS122.1A. Fig. 3 muestra las trazas experimentales representativas de contracciones de sacudida isotónica, el acortamiento y la fuerza registrados para varias poscargas que oscilaban entre 20% y 100% P_0 en un LVPM de ratas que recibieron HS122.1A (Fig. 3A) y ratas de control (Fig. 3B). El acortamiento y el trabajo obtenidos en LVPMs de ratas que

recibieron HS122.1A (C) y ratas de control (D) se presenta en Fig. 3 C-D. Como se muestra en Fig. 3C para las poscargas mínimas ($0,2 P_0$) el acortamiento máximo de LVPM de las ratas que recibieron HS122.1A aumentaba 47% comparado con ratas de control (Fig. 3D) ($p < 0,05$). La cantidad máxima de trabajo normalizado para el área de la sección transversal y longitud del músculo ($1,24 \pm 0,16 \mu\text{J}$) (Fig. 3C) resultaba dos veces mayor ($p < 0,01$) que en los animales de control ($0,58 \pm 0,21 \mu\text{J}$) (Fig. 3D). Fig. 3E-F muestran una curva de velocidad de acortamiento determinada con la ecuación de Hill sobre un LVPM simple procedente de ratas que recibieron el suplemento (Fig. 3E) y ratas de control (Fig. 3F).

La curva fuerza-velocidad representativa se linealiza para obtener las constantes de Hill a y b, que se determinan sobre un LVPM de ratas que recibieron HS122.1A (Fig. 3E) y de control (Fig. 3F). En el inserto, la ecuación de Hill para una hipérbola $(P+a)(V+p) = (P_0+a)b$, se ha adaptado a su forma lineal $(P_0-P)/V = 1B/(P+a)$, y se ha representado gráficamente $(P_0-b)/V$ en función de P. Esta curva será lineal si los puntos de los que se toma forman una hipérbola verdadera, (P = carga, V = velocidad de acortamiento, y a y b son constantes). La fuerza-velocidad y la potencia desarrollada determinadas sobre LVPMs de ratas que recibieron HS122.1A (Fig. 3G) y ratas de control (Fig. 3H), se muestran en Fig. 3 G-H. La velocidad de acortamiento era mayor para los músculos de las ratas HS122.1A (Fig. 3G) que para las ratas de control (Fig. 3H) para todas las cargas aplicadas. En los músculos que recibieron el suplemento la velocidad máxima de acortamiento (V_{max}) de $1,52 \pm 0,14 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{longitud del músculo}^{-1}$ era significativamente mayor ($p < 0,05$) que la de $1,01 \pm 0,21 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{longitud del músculo}^{-1}$ para el músculo de control. Se encontró que los músculos de las ratas que recibieron el suplemento desarrollaban una tensión significativamente ($p < 0,05$) mayor antes que la velocidad de acortamiento se redujera a cero, con un promedio de $36,76 \pm 8,65 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ comparada con $23,35 \pm 5,61 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-2}$ para LVPM de ratas de control. En lo que respecta a la potencia obtenida a medida que aumentaba el producto entre la velocidad de acortamiento y las cargas, el valor máximo ($9,24 \pm 2,22 \mu\text{W}\cdot\text{CSA}^{-1}\cdot\text{longitud del músculo}^{-1}$) era dos veces mayor en las ratas que recibieron HS122.1A ($p < 0,05$) (Fig. 3G) que en las ratas de control ($4,44 \pm 1,02 \mu\text{W}\cdot\text{CSA}^{-1}\cdot\text{longitud del músculo}^{-1}$) (Fig. 3H).

Discusión

Los resultados presentes muestran que el aporte de HS122.1A, una coformulación de Propionil L-carnitina, Coenzima Q₁₀, Riboflavina y Ácido pantoténico, provoca cambios funcionales positivos sobre las funciones mecánicas de los músculos cardiacos en la rata. En particular, HS122.1A mejoraba la velocidad de acortamiento, el acortamiento, el trabajo y la potencia del músculo papilar incrementados por el mecanismo de Frank-Starling.

Un aumento en el número total de filamentos contráctiles puede haber contribuido hacia el incremento de la tensión activa desarrollada observada en los músculos cardiacos y lisos. El tratamiento, sin embargo, no parecía influir en la densidad de los filamentos contráctiles, dado que no se encontraron diferencias significativas en ningún caso en la ratio especímenes de peso seco/peso corporal entre los animales que recibieron el suplemento y los de control. Adicionalmente, el deterioro de las fibras era minimizado posiblemente por utilización de una porción de la pared ventricular para fijar el músculo al clip transductor.

Es sabido que la velocidad máxima de acortamiento está correlacionada con la velocidad de hidrólisis del ATP, que es catalizada por la miosina ATPasa. Sobre una base teórica, el aumento de la velocidad de acortamiento observado en todos los especímenes de los animales que recibieron el suplemento podría provenir de: 1) un aumento en la cantidad y/o actividad de la miosina ATPasa, 2) una disponibilidad incrementada de ATP en células contráctiles musculares individuales.

En conclusión, los descubrimientos de los inventores indican que HS122.1A mejora la actividad bioenergética de las células musculares cardiacas, posiblemente sobre la base de una producción incrementada de energía.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un suplemento dietético caracterizado por estar constituido por:
- 5 - como ingredientes activos, una combinación de propionil L-carnitina, o una sal farmacológicamente aceptable de la misma y opcionalmente una carnitina seleccionada del grupo constituido por L-carnitina, acetil-L-carnitina, valeril-L-carnitina, isovaleril-L-carnitina y butiril-L-carnitina, o las sales farmacológicamente aceptables de las mismas o mixturas de las mismas,
 - 10 b) coenzima Q₁₀;
 - c) riboflavina;
 - d) ácido pantoténico, mezclados o envasados por separado; y
 - los componentes opcionales siguientes:
 - 15 f) un aminoácido seleccionado del grupo constituido por valina, leucina, isoleucina o mixturas de las mismas;
 - g) una creatina seleccionada del grupo constituido por creatina y fosfocreatina o mixturas de las mismas; y
 - h) una sal mineral.
- 2.- El suplemento dietético de la reivindicación 1, caracterizado porque en el mismo la sal farmacológicamente aceptable se selecciona del grupo constituido por cloruro; bromuro; yoduro; aspartato, aspartato ácido; citrato, citrato ácido; fosfato, fosfato ácido; fumarato, fumarato ácido; glicerofosfato; glucosa-fosfato; lactato; maleato, maleato ácido; mucato; orotato; oxalato, oxalato ácido; sulfato, sulfato ácido; tartrato; tricloroacetato; trifluoroacetato y metano-sulfonato.
- 3.- El suplemento dietético de la reivindicación 1, caracterizado porque en el mismo la sal mineral (h) se selecciona del grupo constituido por citrato disódico, fosfato monopotásico, lactato de calcio y taurato de magnesio.
- 25 4.- El suplemento dietético de la reivindicación 1, caracterizado porque en el mismo la ratio en peso (a):(b):(c):(d) oscila desde 10:0,04:0,08:0,4 a 1:4:4:20.
- 5.- El suplemento dietético de la reivindicación 4, caracterizado porque en el mismo la ratio en peso (a):(b):(c):(d) oscila desde 10:2:2:2 a 1:1:1:5.
- 6.- El suplemento dietético de la reivindicación 1, en forma de tabletas, pastillas, píldoras, cápsulas y granulados.
- 30 7.- El suplemento dietético de la reivindicación 6, en forma de dosis unitarias que comprende:
- | | | | |
|--------------------------|-------------|---|----------|
| propionil L-carnitina | desde 50 mg | a | 2000 mg |
| coenzima Q ₁₀ | desde 5 mg | a | 200 mg |
| riboflavina | desde 5 mg | a | 200 mg |
| ácido pantoténico | desde 10 mg | a | 1000 mg. |
- 8.- Un método para facilitar la capacidad de los músculos esqueléticos a fin de sostener periodos prolongados de actividad física intensa, caracterizado porque comprende administrar un suplemento dietético de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 35 9.- Un método de proporcionar energía y refuerzo de la musculatura esquelética, caracterizado porque comprende administrar un suplemento dietético de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es para comodidad del lector únicamente. No forma parte del documento de la patente europea. Aun cuando se tuvo gran cuidado al reunir las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes (EPO) declina toda responsabilidad a este respecto.

5 **Documentos de patente citados en la descripción**

- US 4687782 A [0005]
- US 5292538 A [0005]
- US 5889062 A [0015]
- US 6479069 B1 [0015]
- WO 0121208 A1 [0015]
- WO 0174361 A1 [0015]
- US 20030129177 A1 [0015]
- US 5952379 A [0029]
- US 4602039 A [0030]

10

15

Literatura no de patentes citada en la descripción

- R. Vargiu et al. Physiology & Behavior, 2002, vol. 76, 257-263 [0015]
- Int. J. Pharm., 1986, vol. 33, 201-217 [0028]

20

Figura 1

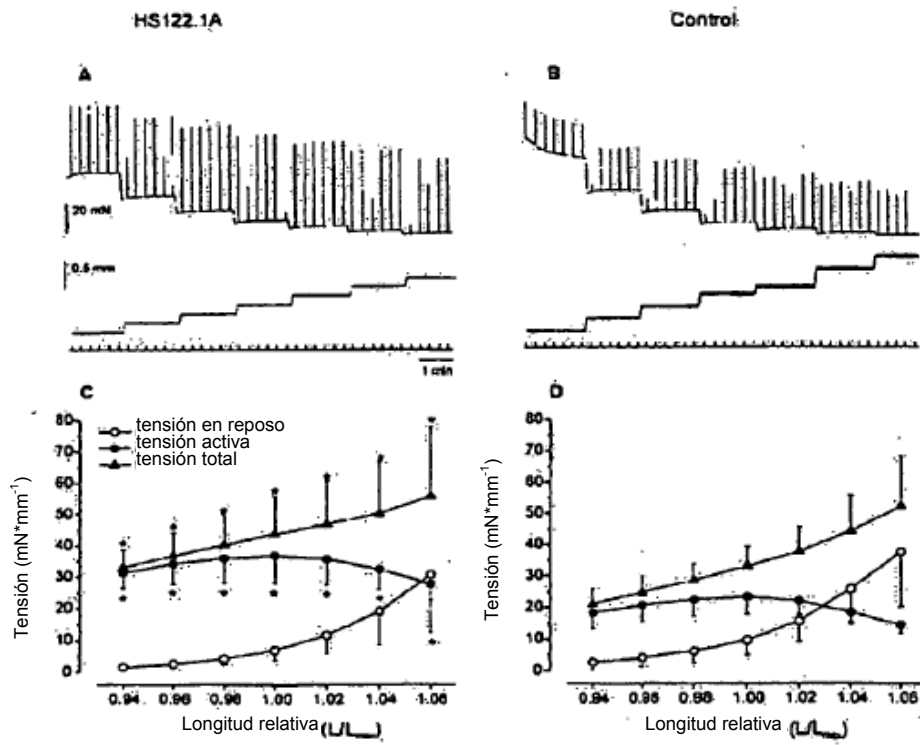


Figura 2

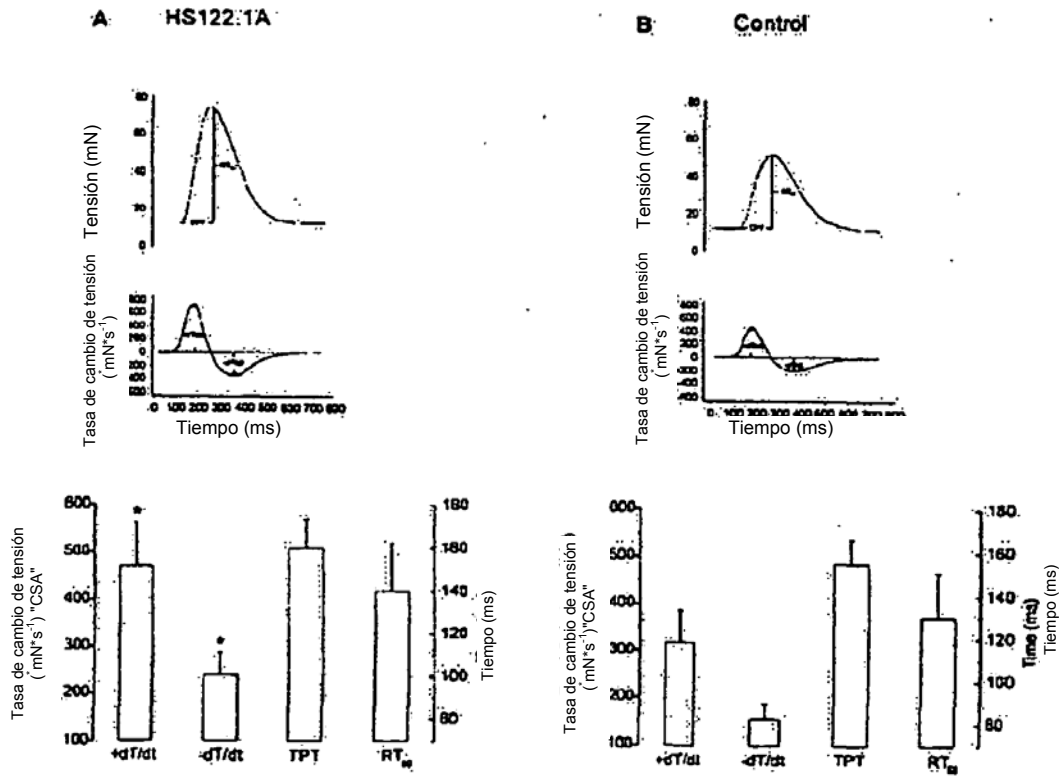


Figura 3

