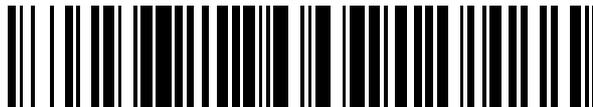


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 921**

51 Int. Cl.:

<b>A23L 1/054</b>	(2006.01)	<b>A23C 9/152</b>	(2006.01)
<b>A23L 1/09</b>	(2006.01)		
<b>A23C 11/08</b>	(2006.01)		
<b>A23J 1/08</b>	(2006.01)		
<b>A23J 3/34</b>	(2006.01)		
<b>A23L 1/305</b>	(2006.01)		
<b>A23L 2/66</b>	(2006.01)		
<b>A23C 9/20</b>	(2006.01)		
<b>A23L 1/236</b>	(2006.01)		
<b>A23L 2/52</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09737995 .2**
- 96 Fecha de presentación: **09.04.2009**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2282641**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2011**

54 Título: **Composición que comprende carbohidratos y péptidos que comprenden triptófano**

30 Prioridad:

**29.04.2008 EP 08155387**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**17.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**17.12.2012**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)  
Het Overloon 1  
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**VAN BECKHOVEN, RUDOLF FRANCISCUS W. M.;  
DUCHATEAU, ALEXANDER LUCIA LEONARDUS;  
EDENS, LUPPO;  
KLEINHERENBRINK, FRANCISCUS ANTONIUS M.;  
KLOEK, JORIS y  
ROOS, ANDRE LEONARDUS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 392 921 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**

Composición que comprende carbohidratos y péptidos que comprenden triptófano.

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una formulación que comprende péptidos que contienen triptófano junto con glucosa disponible rápidamente y glucosa disponible lentamente (es decir carbohidratos "rápidos" y "lentos").

**Antecedentes de la invención**

10 Recientemente, se han publicado diversos informes acerca del beneficio que se cree aporta el triptófano sobre varios aspectos del comportamiento, el estado de ánimo, la función cerebral y el desarrollo del cerebro humano, cuando dicho triptófano es absorbido por el cerebro. Ejemplos de tales informes son WO 99/55174, WO 00/42868, y WO 2005/023017.

15 El triptófano es un aminoácido presente en muchas proteínas, como v.g. las proteínas del lactosuero, pero también las proteínas animales contienen triptófano. El triptófano puede ser absorbido en la sangre, y desde la sangre en el cerebro, después de ingestión de una proteína que contiene triptófano. Sin embargo, el triptófano no es el único aminoácido absorbido, y de hecho cuando se ingiere una composición media de proteínas animales, el nivel de triptófano absorbido por el cerebro es tan bajo debido a la absorción competitiva de otros aminoácidos que usualmente no puede observarse efecto significativo alguno atribuible al triptófano. Por tanto, la mayoría de los informes a que se ha hecho referencia anteriormente utilizan proteínas o fracciones proteínicas ricas en triptófano, o el aminoácido triptófano libre (el último opcionalmente en combinación con otros aminoácidos libres y/o proteínas).

25 El uso de triptófano como aminoácido libre presenta desventajas, en el sentido de que la legislación alimentaria limita en muchos países el uso de triptófano como aminoácido libre en los alimentos.

Las proteínas ricas en triptófano tienen límites naturales en cuanto al nivel de triptófano y su ratio a aminoácidos neutros grandes, que es pertinente para la absorción de triptófano por el cerebro.

30 El pensamiento reciente es que los péptidos ricos en triptófano pueden ser una fuente satisfactoria para obtener triptófano suficiente en el cerebro para los efectos deseados y pueden aplicarse más fácilmente en los alimentos que los aminoácidos libres. Tales péptidos ricos en triptófano son preferiblemente pobres en los aminoácidos con los que se cree que la competición en la absorción por el cerebro es alta: los denominados aminoácidos neutros grandes (LNAA), que son: leucina, isoleucina, valina, tirosina, fenilalanina (y dependiendo de la definición de LNAA algunos utilizan también metionina). Por tanto, se prefiere proporcionar preparaciones de péptidos que contienen un nivel elevado de triptófano y tienen una ratio triptófano/LNAA alta. Se considera que la metionina no tiene un efecto metabólico beneficioso en el contexto de esta invención, y por tanto no se considera para el propósito de esta invención como uno de los LNAA.

40 EP 661004 describe piensos para animales que comprenden triptófano en combinación con v.g. dextrina. Dicha composición está destinada a mantenimiento del crecimiento y aumento del peso corporal a temperaturas ambientales altas cuando los animales tienen poco apetito.

45 WO 2004/112803 describe métodos para tratamiento de los síntomas del síndrome premenstrual por proporcionar una composición que contiene una proteína que tiene una ratio triptófano/LNAA alta, en combinación con carbohidratos digeribles rápidamente.

50 WO 2006/130567 describe métodos para tratamiento de la melancolía invernal, el trastorno afectivo estacional (SAD), y los trastornos depresivos; así como el ansia de carbohidratos, el aumento de peso y los síntomas del estado de ánimo asociados con ello, por administración a un individuo de una composición rica en carbohidratos con contenido mínimo de proteínas, o una composición rica en carbohidratos que contiene triptófano o una proteína o péptido rica(o) en triptófano.

55 En US 2003039739 se describen composiciones y métodos para pérdida de peso que son adecuados para individuos sensibles a hiperacidez gástrica o reflujo gastroesofágico. Las composiciones incluyen en parte un tentempié que tiene dos o más carbohidratos rápidamente digeribles, en el cual el alimento o una mixtura acuosa de alimento y agua tiene un pH igual a o mayor que aproximadamente 6, y en el cual el tentempié está sustancialmente exento de proteínas. El plan experimental/de test de la invención asignaba las cantidades de proteína y carbohidrato diferentemente en cada comida y tentempié a fin de asegurar que después de las comidas almuerzo y cena, la ratio de triptófano en plasma a la de los aminoácidos neutros grandes circulantes no se reduce, de tal modo que la ratio podría elevarse significativamente después del consumo del tentempié rico en carbohidratos.

60 En WO 02/46210 se describe un método para aumentar el nivel de triptófano en hidrolizados de proteínas de lactosuero. En el método utilizado, el lactosuero es hidrolizado primeramente a pH ácido por una o más proteasas ácidas, preferiblemente por una pepsina, rennina, proteasa ácida fúngica, quimosina, papaína, bromelaina, quimopapaína o

ficina. Las condiciones de incubación preferidas están comprendidas entre pH 1,5 y 3,5 y se seleccionaron para generar péptidos que tengan una naturaleza hidrófoba. La hidrólisis se lleva a cabo deliberadamente de tal modo que los residuos triptófano llegan a incorporarse en péptidos hidrófobos grandes. Debido al hecho de que el triptófano se presenta en péptidos relativamente grandes, la absorción de triptófano en la sangre se retardará limitando así las posibilidades de aplicación de la preparación como alimento o ingrediente de bebidas, especialmente en combinación con otras proteínas. Otra desventaja del uso de tales péptidos grandes es que dichos péptidos pueden dar lugar a reacciones alérgicas. Tales reacciones a las proteínas del lactosuero son bien conocidas.

WO 2008/052995 se refiere a péptidos que contienen triptófano, que pueden contener adicionalmente carbohidratos.

La insulina puede promover selectivamente la absorción de los LNAA por diversos tejidos, haciendo así disponible más triptófano para absorción en el cerebro, dado que los LNAA compiten con el triptófano para absorción en el cerebro. Así, niveles considerables de insulina en plasma pueden ser beneficiosos para los efectos deseados de triptófano en el cerebro. Tales efectos deseados se refieren al campo de la función cerebral, el estado de alerta, el sueño, el estado de ánimo, la concentración, y aspectos análogos. Los niveles elevados de insulina en plasma pueden promoverse por la presencia de carbohidratos rápidamente digeribles junto con una composición que contiene triptófano, pero ello puede conducir a una disminución de la glucosa en sangre, v.g., aproximadamente 2 horas después de la ingestión y/o no ser capaz de mantener niveles considerables de glucosa en sangre durante v.g. 3-4 horas para que el cerebro alcance el beneficio máximo del triptófano y/o para la función óptima del cerebro, el estado de alerta, el sueño, el estado de ánimo, la concentración, la cognición en general y esferas análogas.

### Sumario de la invención

Por consiguiente, había necesidad de una composición que proporcione a la vez triptófano en una forma que permita absorción satisfactoria en el cerebro, que proceda de una fuente ampliamente disponible a escala industrial, tenga una ratio triptófano/LNAA alta, alergenicidad baja, y que pueda utilizarse en formulaciones (v.g. para humanos, como v.g. los niños) que pueden ser beneficiosas para uno o más del funcionamiento del cerebro, el estado de alerta, el sueño, el estado de ánimo, la concentración, la cognición, y esferas análogas.

Esto se ha conseguido ahora (al menos en parte) por una formulación que comprende al menos dos péptidos (o composiciones de péptidos) que contienen triptófano diferentes y solubles en agua, y en donde la ratio triptófano/LNAA de la formulación es al menos 0,15, preferiblemente entre 0,15 y 1,8, formulación que comprende además una composición de glucosa disponible rápidamente (RAG) y una composición de glucosa disponible lentamente (SAG), en donde la composición RAG y la composición SAG están presentes en la composición comestible en ratios en peso seco de: composición RAG: composición SAG entre 1:0,5 y 1:4, preferiblemente entre 1:0,8 y 1:3, más preferiblemente entre 1:1 y 1:3. Son estos intervalos los que se cree son beneficiosos a la vez para la absorción del triptófano y para la función cerebral, asimismo a lo largo de varias horas.

Preferiblemente, en la formulación de acuerdo con esta invención la ratio en peso de los péptidos que contienen triptófano: composición RAG está comprendida entre 1:2 y 1:20, preferiblemente entre 1:3 y 1:15, más preferiblemente entre 1:3 y 1:8. Son estos intervalos los que se cree son beneficiosos a la vez para la absorción del triptófano y la función cerebral, también a lo largo de varias horas.

Se prefiere también en esta invención que la formulación de acuerdo con la presente invención comprenda de 0,5 a 5% (preferiblemente 0,8 a 3%) de peso seco de la composición peptídica que comprende triptófano en un producto fácil de consumir, dado que ello permite una formulación fácil de productos consumibles, v.g., bebidas, que tienen un volumen y concentración de triptófano aceptables.

Una realización adicional de esta invención es una formulación que comprende al menos dos péptidos diferentes seleccionados de di- o tripéptidos, en la cual dos péptidos seleccionados de di- o tripéptidos están presentes cada uno en una cantidad de al menos 5% molar de la cantidad total de di- y tripéptidos, y en la cual más de 30% molar del triptófano total está presente como triptófano combinado en péptidos, y preferiblemente más de 40% molar, más preferiblemente más de 50% molar, aún más preferiblemente más de 60% molar, todavía más preferiblemente más de 70% molar y muy preferiblemente más de 80% molar del triptófano combinado en péptidos está presente en la forma de un di- o un tripéptido, teniendo preferiblemente la formulación una ratio triptófano/LNAA mayor que 0,15, preferiblemente entre 0,15 y 1,8, formulación que comprende además una composición de glucosa disponible rápidamente (RAG) y una composición de glucosa disponible lentamente (SAG), en donde la composición RAG y la composición SAG están presentes en la formulación en ratios de peso seco de: composición RAG:composición SAG entre 1:0,5 y 1:4, preferiblemente entre 1:0,8 y 1:3, más preferiblemente entre 1:1 y 1:3. En lo que antecede, puede preferirse adicionalmente que la ratio de peso (seco) de los péptidos que contienen triptófano:composición RAG es entre 1:2 y 1:20, preferiblemente entre 1:3 y 1:15, más preferiblemente entre 1:3 y 1:8. Son estas cantidades e intervalos los que se cree son beneficiosos a la vez para la absorción de triptófano y para la función cerebral, asimismo a lo largo de varias horas.

Las composiciones de glucosa disponible rápidamente (RAG) y composiciones de glucosa disponible lentamente (SAG) se definen en la "descripción detallada de la invención".

Se prefiere también aquí que la formulación de acuerdo con la presente invención comprenda 0,5 a 5% (preferiblemente 0,8 a 3%) de peso seco de la composición de péptidos que comprenden triptófano en un producto listo para consumir.

5 En la formulación de acuerdo con la presente invención, la composición de péptidos que comprenden triptófano comprende preferiblemente péptidos que contienen triptófano que pueden obtenerse por un proceso para producir una composición que comprende un péptido soluble en agua que comprende triptófano, preferiblemente al menos dos péptidos solubles en agua que contienen triptófano, y que tiene preferiblemente una ratio triptófano/LNAA mayor que 0,15, preferiblemente entre 0,15 y 1,8, que comprende hidrolizar lisozima, preferiblemente lisozima de huevo de gallina, preparar un hidrolizado que tiene un Grado de Hidrólisis (DH) entre 5 y 45, y separar opcionalmente parte de los péptidos que contienen arginina o lisina. Preferiblemente, tales péptidos que comprenden triptófano para uso en la formulación de acuerdo con la presente invención comprenden AW o GNW, más preferiblemente AW y GNW. Dicho hidrolizado tiene preferiblemente un DH entre 10 y 40. Son estas cantidades e intervalos los que se cree son beneficiosos a la vez para la absorción de triptófano y para la función cerebral, asimismo a lo largo de varias horas.

20 En la formulación de acuerdo con la presente invención, la composición de péptidos que comprenden triptófano se encuentra preferiblemente en la forma de una composición que comprende al menos dos péptidos solubles en agua diferentes y en donde la ratio molar triptófano/LNAA de la composición es al menos 0,15, preferiblemente entre 0,15 y 1,8. Preferiblemente, esta composición de péptidos que comprenden triptófano comprende AW o GNW, preferiblemente AW y GNW y muy preferiblemente AW y GNW en donde la ratio molar de AW a GNW es entre 1 a 2 y 10 a 1, preferiblemente entre 1 a 2 y 5 a 1. Así, en la presente formulación la composición de péptidos que comprenden triptófano se encuentra preferiblemente en la forma de una composición de péptidos solubles en agua que son ricos en triptófano. Ventajosamente, en la presente formulación la composición de péptidos que contienen triptófano comprende preferiblemente al menos dos di- o tripéptidos diferentes, en donde dos péptidos seleccionados de di- o tripéptidos están presentes en una cantidad de al menos 5% molar de la cantidad total de di- y tripéptidos, y en cuya composición de péptidos que comprenden triptófano más de 30% molar, preferiblemente más de 40% molar, más preferiblemente más de 50% molar, aún más preferiblemente más de 60% molar, todavía más preferiblemente más de 70% molar y muy preferiblemente más de 80% molar del triptófano combinado en péptidos está presente en la forma de un di- o tripéptido, preferiblemente la composición de péptidos que comprenden triptófano tiene una ratio triptófano/LNAA mayor que 0,15, preferiblemente entre 0,15 y 1,8. Por triptófano combinado en péptidos se entiende un triptófano que está presente como aminoácido en un péptido. Son estas cantidades e intervalos los que se cree son beneficiosos a la vez para la absorción de triptófano y para la función cerebral, asimismo a lo largo de varias horas.

35 La composición de péptidos que comprenden triptófano que se utiliza preferiblemente en la formulación de acuerdo con la presente invención es preferiblemente un hidrolizado de lisozima o un hidrolizado de lisozima purificado. Preferiblemente, dicho hidrolizado de lisozima es particularmente rico en residuos arginina. La arginina no pertenece al grupo de aminoácidos neutros grandes (LNAA's) pero es conocida por su efecto estimulante de la insulina. Se ha encontrado que el hidrolizado que se describe en esta memoria puede generar *in vivo* ratios triptófano/LNAA en plasma sanguíneo altas. Se encontró que las ratios triptófano/LNAA detectadas en plasma sanguíneo, son superiores a la ratio triptófano/LNAA del hidrolizado. Otra ventaja adicional de la composición de péptidos que contienen triptófano descrita en esta memoria es que los péptidos que contienen triptófano son muy pequeños, de tal modo que incluso en combinación con productos ricos en proteínas con ratios triptófano/LNAA menos favorables, el hidrolizado puede generar inmediatamente ratios triptófano/LNAA en plasma sanguíneo altas. Esto hace por tanto dicha composición de péptidos que contienen triptófano muy adecuada en la formulación de la presente invención. La composición de péptidos que contienen triptófano que se utiliza en la formulación de la presente invención puede comprender adicionalmente triptófano libre. Preferiblemente, el hidrolizado de la composición de péptidos que contienen triptófano no contiene más de 1% en peso (sobre materia seca) de triptófano libre.

#### 50 Descripción detallada de la invención

Por lo que respecta a glucosa disponible lentamente (SAG): esta expresión se refiere a un carbohidrato que se digiere probablemente por completo en el intestino delgado pero a un ritmo más lento que v.g. glucosa o sacarosa, dando como resultado niveles más bajos de glucosa en sangre que se mantienen durante más largo tiempo. Por el contrario, la glucosa disponible rápidamente (RAG) es un carbohidrato que se hidroliza rápidamente, lo que da como resultado concentraciones elevadas de glucosa en sangre, que se mantienen sólo durante un tiempo relativamente corto.

60 Englyst et al. (Englyst KN, Englyst HN, Hudson GJ, Cole TJ, Cummings JH. Rapidly available glucose in foods: an *in vitro* measurement that reflects the glycaemic response. *American Journal of Clinical Nutrition* (1999) 69:448-54.) utilizaron un test *in vitro* que está correlacionado significativamente con las curvas de glucosa *in vivo*. La medida *in vitro* de RAG y SAG podría predecir la respuesta glucémica medida en estudios humanos. Englyst et al. definían RAG en la situación *in vitro* por la cantidad de carbohidrato hidrolizado a glucosa al cabo de 20 minutos (denominada G20). Asimismo, la cantidad hidrolizada se medía también después de 120 minutos (denominada G120). La cantidad hidrolizada durante estos 120 minutos se consideraba que estaba disponible para absorción en el intestino delgado. Cualquier cantidad hidrolizada después de los 120 minutos se consideraba no disponible para absorción y

se consideraba resistente. La cantidad de carbohidratos hidrolizados entre 20 y 120 minutos (es decir G<sub>120</sub> -G<sub>20</sub>) se definía como SAG. Para el propósito de esta invención RAG y SAG se entienden aquí del mismo modo que fueron definidas por Englyst et al.

5 La técnica in vitro utilizada por Englyst et al para la medida de las fracciones RAG y SAG en las cuales está basada la definición de RAG y SAG en esta memoria, basada en la medida por HPLC de la glucosa liberada por un alimento de test durante la incubación temporizada con enzimas digestivas en condiciones estandarizadas, se describe con mayor detalle más adelante.

10 Determinación de los materiales RAG/SAG

Los tubos de polietileno utilizados (50 ml) eran de Falcon (Oxford, Reino Unido). Las bolas de vidrio (1,5 cm de diámetro) eran de Magnet Wholesale (Halesworth, Reino Unido). El baño de agua de agitación era un modelo SS-40-2 de Grant Instruments Ltd (Cambridge, Reino Unido). El baño estaba provisto de clips para mantener los tubos de 50 ml en posición exactamente horizontal, sumergidos completamente en el agua, con el eje largo de cada tubo en la dirección del movimiento. El sistema HPLC era de Dionex (UK) Ltd. (Camberley, Reino Unido) y se describe en detalle más adelante. Los reactivos eran de Sigma (Poole, Reino Unido) o Merck (Poole, Reino Unido) a no ser que se indique otra cosa.

20 La solución estándar interna era 40 g arabinosa/l de agua con ácido benzoico semisaturado. La mixtura de azúcares de stock era 50 g glucosa/l y 25 g fructosa/l en agua con ácido benzoico semisaturado. Los azúcares se secaron hasta peso constante a presión reducida sobre pentóxido de fósforo antes de su utilización.

25 Las enzimas utilizadas eran pepsina de Sigma (No. de catálogo P-7000; St Louis), amiloglucosidasa de Novo Nordisk (AMG 400 L, tipo LP; Bagsvaerd, Dinamarca), pancreatina de Sigma (No. de catálogo P-7545), e invertasa de Merck (No. de catálogo 390203D). La mixtura de enzimas se preparó el día de utilización. Para 18 muestras, se pesaron 3,0 g de pancreatina en cada uno de 6 tubos de centrifuga y se añadió a cada uno una varilla de agitación magnética y 20 ml de agua. La pancreatina se suspendió por mezcladura enérgica y se mezcló luego durante 10 min en un agitador magnético. Los tubos se centrifugaron a 1500 x g durante 10 min; se separaron 15 ml del sobrenadante turbio de cada tubo (90 ml totales) en un matraz y se añadieron 4 ml de amiloglucosidasa y 6 ml de invertasa, y se mezcló bien el todo.

Medida in vitro de RAG, SAG, glucosa total y fracciones de almidón

35 Muestras de alimento (que contenían < 0,6 g de carbohidrato) se pesaron al miligramo más próximo en tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml. Se añadió solución estándar interna (5 ml de 40 g arabinosa/l) y 10 ml de solución pepsina-goma guar recién preparada (5 g pepsina/l y 5 g goma guar/l en 0,05 mol HCl/l). Se taparon los tubos y los contenidos se mezclaron de modo enérgico y se pusieron en un baño de agua a 37° C durante 30 min para permitir la hidrólisis de las proteínas por la pepsina. Se añadieron a cada tubo 5 mililitros de acetato de sodio 0,5 mol/l (equilibrado a 37°C) para formar un tampón a pH 5,2. Se añadieron 5 bolas de vidrio y los tubos se taparon y se agitaron suavemente para dispersar los contenidos, y se pusieron luego en el baño de agua a 37°C para alcanzar el equilibrio durante unos cuantos minutos. En el baño de agua de agitación, las bolas de vidrio funcionan para disgregar mecánicamente la estructura física de las muestras durante la incubación principal. La goma guar normaliza la viscosidad, mantiene la muestra en suspensión, y evita su sedimentación y la disgregación excesiva por las bolas de vidrio.

45 Se retiró un tubo de muestra del baño de agua a 37°C y se añadieron 5 ml de la mixtura de enzimas. El tubo se tapó inmediatamente y su contenido se mezcló suavemente por inversión antes de fijarlo en posición horizontal en el baño de agua de agitación a 37°C. La acción de agitación del baño de agua se inició en este momento, que se tomó como tiempo cero para la incubación y no se interrumpió hasta que se recogieron todas las porciones G<sub>120</sub> (véase más adelante). Se añadió la mixtura de enzimas al resto de los tubos de muestra a intervalos de 1 minuto, para ayudar a la temporización de las incubaciones, y los tubos se pusieron luego en el baño de agua de agitación. Cada tubo se retiró del baño exactamente 20 minutos después de la adición de la mixtura de enzimas y se añadieron 0,2 ml del contenido a 4 ml de etanol absoluto y se mezcló enérgicamente para detener la hidrólisis; ésta se consideró como la porción G<sub>20</sub>. Se devolvió el tubo al baño de agua de agitación inmediatamente después de tomar la muestra. Después de 100 minutos más (una incubación de 120 min), se añadieron otros 0,2 ml a 4 ml de etanol absoluto y se mezcló enérgicamente; ésta era la porción G<sub>120</sub>.

60 Se incluyeron almidón de patata y harina blanca de trigo como materiales de referencia en cada lote de muestras analizado y se incluyeron 2 blancos de reactivos, uno que contenía 4 ml de mixtura de azúcares de stock, para corregir por el contenido de azúcar de las preparaciones enzimáticas. Las condiciones de hidrólisis se calibraron con almidón de patata, harina blanca de trigo, y copos de maíz como materiales de referencia. (Los materiales de referencia y las enzimas están disponibles de Englyst Carbohydrate Services Ltd., Reino Unido). El almidón de patata (secado al aire, de Kartoffelmel Centralen, Herming, Dinamarca) tiene un contenido elevado de almidón resistente y se utilizó para establecer la velocidad óptima del baño de agua de agitación. Si el valor G<sub>120</sub> para el almidón de patata era demasiado alto, se reducía la velocidad de carrera y viceversa.

65

## Medida por HPLC de los azúcares

Se utilizaron para calibración dos estándares de azúcar. El estándar 1 era 1 ml y el estándar 2 era 10 ml de la mixtura de azúcares de stock, completado cada uno a 20 ml con agua, a la que se añadieron 5 ml de la solución estándar interna y se mezcló bien; se retiraron luego 0,2 ml de esta mixtura y se añadieron a tubos que contenían 4 ml de etanol absoluto.

Antes del análisis HPLC, todas las fracciones etanólicas se centrifugaron durante 5 min a  $1500 \times g$  a la temperatura ambiente. La cantidad tomada para análisis de los estándares de azúcar y las porciones  $G_{20}$  y  $G_{120}$  eran 70  $\mu$ l. Las muestras se pusieron en viales de HPLC, se añadió 1 ml de agua desionizada, y se mezclaron las mismas energícamente.

Se utilizó un autoinyector (modelo AS3500; Dionex) para inyectar 20  $\mu$ l de las soluciones etanólicas diluidas. La separación de los azúcares se realizó con una columna analítica de intercambio aniónico (Carbopac PA100; Dionex) y una columna de guarda (Carbopac PA10; Dionex) utilizando una bomba de gradiente (modelo GP40; Dionex). La conmutación de columna y una columna de guarda de intercambio aniónico (Aminotrap; Dionex) se utilizaron para prevenir que los aminoácidos y los péptidos alcanzaran la columna analítica. Los eluyentes, agua de alta pureza y 200 mol de NaOH/l (16 ml solución 50% NaOH/l de agua desgasificada de alta pureza) se desgasificaron. El caudal era 0,8 ml/min y las condiciones de elución se indican en la tabla siguiente:

## Secuencia de condiciones de elución para la medida de azúcares por HPLC

Posición del conmutador <sup>1</sup>	NaOH mmol/l	Tiempo Min
A	10	0 – 3,5
B	70	3,6 – 14,0
B	200	14,1 – 15,0
B	10	15,1 – 20,0

<sup>1</sup> En la posición del conmutador A, el flujo es de Aminotrap (Dionex UK Ltd, Camberley, Reino Unido) a columna de guarda a columna de separación. En la posición del conmutador B, el flujo es de columna de guarda a columna de separación a Aminotrap. La inyección de la muestra se realiza en el tiempo 0,1 min.

La detección de los monosacáridos se realizó con un detector electroquímico (modelo ED40; Dionex) con los potenciales de pulso ( $E$ ) y duraciones ( $t$ ) siguientes:  $E_1$ , 0,05 V;  $t_1$ , 400 ms;  $E_2$ , 0,75 V;  $t_2$ , 200 ms;  $E_3$ , 0,15 V; y  $t_3$ , 400 ms. El tiempo de respuesta era 1 s, y la señal de salida en el detector se ajustó a 300 nA. Se utilizó un sistema de tratamiento de datos (DX-500; Dionex) para integrar y representar gráficamente los resultados.

Los valores para RAG y SAG se calcularon a partir de los valores  $G_{20}$  y  $G_{120}$  medidos como sigue:

$$\text{RAG} = G_{20}$$

$$\text{SAG} = G_{120} - G_{20}$$

Las composiciones preferidas de glucosa disponible lentamente (SAG) en la formulación de acuerdo con la presente invención comprenden uno o más de: pululano que tiene un peso molecular medio numérico comprendido entre 1.000 y 45.000 daltons (preferiblemente 5.000-40.000 daltons), isomaltulosa, trehalosa, y/o mixturas de los mismos. Se prefiere isomaltulosa como fuente de glucosa de disposición lenta, dado que éstas son fuentes disponibles comercialmente.

Las composiciones preferidas de glucosa disponible rápidamente (RAG) en la formulación de acuerdo con la presente invención comprenden uno o más de: glucosa, sacarosa, maltodextrina, almidón, hidrolizado de almidón, dextrosa, y/o mixturas de los mismos, dado que éstas son bien conocidas en aplicaciones alimentarias y permiten procesamiento fácil.

En la formulación de acuerdo con la presente invención, cuando se trata de una formulación final lista para consumo, se prefiere que la cantidad total conjunta de glucosa disponible rápidamente y glucosa disponible lentamente sea 5 a 20% (en peso) de la formulación total lista para consumo, preferiblemente 7 a 15%, v.g. por facilidad de formulación y calidad del producto final (v.g., que no es excesivamente dulce).

La invención se refiere adicionalmente a un producto, en la forma de un líquido listo para beber, que comprende 1-20% en peso de una formulación de acuerdo con la presente invención, dado que ello permite una formulación fácil de productos consumibles, v.g. bebidas, que tienen volumen y concentración de triptófano aceptables.

Se prefiere que los péptidos en la presente formulación comprendan AW o GNW, preferiblemente AW y GNW. En tal caso, la ratio molar de AW a GNW es preferiblemente entre 1 a 2 y 10 a 1, más preferiblemente entre 1 a 2 y 5 a 1. Son estas ratios las que se cree son beneficiosas a la vez para la absorción de triptófano y la función cerebral, asimismo a lo largo de varias horas.

En la formulación de acuerdo con la presente invención, los péptidos que contienen triptófano se obtienen preferiblemente por hidrólisis de lisozima, preferiblemente una lisozima de huevo de gallina.

5 En una realización adicional, la presente invención se refiere a alimentos, comida para mascotas, piensos, bebidas, suplementos dietéticos o composiciones neutracéuticas que comprenden la formulación de acuerdo con la presente invención.

Detalles de la parte de péptidos que contienen triptófano de la presente invención y el modo de fabricación de los mismos se exponen adicionalmente en WO 2008/052995.

10 La composición de péptidos que comprenden triptófano utilizada preferiblemente en la formulación de la presente invención aporta una composición que comprende triptófano presente en forma de péptidos que es muy adecuada para proporcionar un aumento eficaz de la ratio triptófano/LNAA en plasma en un intervalo de tiempo muy corto. Los di- y tripéptidos que comprenden triptófano contribuyen ventajosamente a este aumento. En una realización para la  
 15 composición de péptidos que comprenden triptófano en la formulación de la presente invención, la lisozima, preferiblemente lisozima de huevo de gallina, se (pre)hidroliza enzimáticamente en un proceso industrial, es decir la lisozima (de huevo de gallina) se proporciona preferiblemente en la forma de un hidrolizado. Ofrecidos en la forma de un hidrolizado, la absorción gastro-intestinal de los péptidos que contienen triptófano se facilita notablemente. En otra realización, para la composición de péptidos que comprenden triptófano destinada a la formulación de la presente  
 20 solicitud, la lisozima de huevo de gallina se convierte en un hidrolizado en el cual los niveles de péptidos que comprenden los residuos arginina y lisina cargados positivamente se han reducido. Los últimos hidrolizados se caracterizan por ratios moleculares triptófano/LNAA superiores a 0,15. En otra realización adicional de la formulación RTD de la presente solicitud que comprende la composición de péptidos preferidos que comprenden triptófano, la lisozima de huevo de gallina se convierte en un hidrolizado que comprende una población de péptidos de la cual más de  
 25 50%, preferiblemente más de 60%, más preferiblemente más de 75% de los péptidos presentes tienen un peso molecular inferior a 500 Da. Esto con la salvedad de que la distribución de pesos moleculares de los péptidos presentes en el hidrolizado se realiza como se describe en la sección Materiales & Métodos de la presente solicitud. Con relación a la ratio preferida triptófano/LNAA (de al menos 0,15): el análisis de aminoácidos del hidrolizado se  
 30 lleva a cabo como se describe en la sección Materiales & Métodos de la presente solicitud.

Una "proteína" o "polipéptido" se define en esta memoria como una cadena que comprende más de 30 residuos de aminoácidos.

35 Un "péptido" o "oligopéptido" se define en esta memoria como una cadena de al menos dos (preferiblemente 2 a 30) aminoácidos que están enlazados por enlaces peptídicos. Los términos "péptido" y "oligopéptido" se consideran sinónimos (como se reconoce comúnmente) y ambos términos pueden utilizarse intercambiabilmente cuando lo requiera el contexto.

40 Un péptido "soluble en agua" es un péptido que se disuelve en agua a un pH de 5,0. Todas las fórmulas o secuencias de (oligo)péptidos y polipéptidos de esta memoria se escriben de izquierda a derecha en dirección del término amino al término carboxi, de acuerdo con la práctica común. El código de una sola letra de los aminoácidos utilizados en esta memoria es conocido comúnmente en la técnica y puede encontrarse en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989).

45 Por hidrolizado de proteínas, hidrolizado o proteína hidrolizada se entiende el producto que se forma por hidrólisis enzimática de la proteína, siendo un hidrolizado enriquecido una fracción del hidrolizado de proteínas enriquecida por ejemplo en péptidos seleccionados o en la cual péptidos o polipéptidos se han eliminado del hidrolizado. Así, un hidrolizado enriquecido es preferiblemente una mezcla de péptidos (o una mezcla peptídica). La mezcla peptídica como se utiliza en la presente invención es por consiguiente una mezcla de al menos dos, preferiblemente al menos  
 50 tres, más preferiblemente al menos cuatro péptidos que contienen triptófano. Más preferiblemente, la mezcla comprende una población de péptidos de la cual más de 50%, preferiblemente aún más de 60%, y muy preferiblemente más de 75% de los péptidos presentes tienen un peso molecular inferior a 500 Da. Un péptido que contiene triptófano significa un péptido que comprende al menos un residuo de aminoácido L-triptófano. La ratio triptófano/LNAA representa la ratio molar de triptófano relativa a los niveles de otros Aminoácidos Neutros Grandes (LNAA: es decir la suma de tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina y valina). Excepto por la ratio triptófano/LNAA en plasma, la ratio triptófano/LNAA se refiere únicamente a aminoácidos combinados en péptidos. Así, triptófano, tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina y valina libres no se tienen en cuenta en la ratio triptófano/LNAA.

60 Los aminoácidos combinados en péptidos son aminoácidos que forman parte de un péptido y no aminoácidos libres.

La ratio Tyr/BCAA representa la ratio molar de tirosina con relación a los niveles de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA; es decir la suma de leucina, isoleucina y valina). Preferiblemente, la ratio Tyr/BCAA es mayor que 0,1, preferiblemente mayor que 0,12.

65

La composición de péptidos que comprenden triptófano utilizada preferiblemente en la formulación de la presente invención puede producirse por un proceso como se describe en esta memoria, y tiene un rendimiento de triptófano mayor que 30% basado en triptófano de proteínas, y genera una composición de péptidos solubles en agua que comprenden triptófano. El hecho de que la mayor parte de los residuos triptófano esté incluida en di- o triptéptidos, implica una absorción inmediata en el torrente sanguíneo. Dicha composición de péptidos que comprenden triptófano utilizada preferiblemente en la formulación de la presente invención puede generar también ratios triptófano/LNAA en plasma mayores que la ratio triptófano/LNAA del hidrolizado real. Finalmente, la composición de péptidos que comprenden triptófano utilizada preferiblemente en la formulación de la presente invención se caracteriza también por una antigenicidad muy baja.

En la composición de péptidos que comprenden triptófano utilizada preferiblemente en la formulación de la presente invención se utiliza preferiblemente lisozima de huevo de gallina como sustrato conveniente para proporcionar preparaciones con una ratio triptófano/LNAA alta. La lisozima está presente en la clara de huevo en una concentración de 3-4%. Aprovechando la ventaja de su punto isoeléctrico excepcionalmente alto, la lisozima se aísla industrialmente de la clara de huevo utilizando un solo paso de purificación cromatográfica de cationes. El producto resultante es prácticamente puro y este producto industrialmente disponible tiene un contenido molecular de triptófano de 7,8% y una ratio molecular triptófano/LNAA de al menos 0,15. Así, la lisozima pura tiene una ratio triptófano/LNAA que es significativamente mayor que la alfa-lactalbúmina y/o beta-lactalbúmina puras. Por consiguiente, los hidrolizados de lisozima para la composición de péptidos que comprenden triptófano utilizados preferiblemente en la formulación (y por consiguiente la composición de péptidos que comprenden triptófano propiamente dichos utilizados preferiblemente en la formulación) de la presente invención pueden tener una ratio molar triptófano/LNAA que es mayor que 0,15, siendo más preferiblemente la ratio triptófano/LNAA mayor que 0,20, y aún más preferiblemente la ratio triptófano/LNAA es mayor que 0,23, siendo todavía más preferiblemente la ratio triptófano/LNAA mayor que 0,25 y siendo muy preferiblemente la ratio triptófano/LNAA mayor que 0,30. En general, la ratio molar triptófano/LNAA es inferior a 3,0. Como tal, la lisozima constituye un punto de partida preferido para péptidos o composiciones que contienen triptófano. La lisozima (EC3.2.1.17) es una enzima capaz de hidrolizar los enlaces peptidoglucano específicos en las paredes de las células bacterianas, conduciendo a lisis celular. Son estas ratios las que se cree son a la vez beneficiosas para la absorción de triptófano y para la función cerebral, asimismo a lo largo de varias horas, y pueden conseguirse todavía.

El hidrolizado utilizado preferiblemente para la composición de péptidos que comprenden triptófano en la formulación de acuerdo con la presente invención es eficaz también si se incorpora en matrices de alimentos ricas en contenido de proteínas como las representadas, por ejemplo, por los productos lácteos. Esto es sumamente sorprendente dado que las matrices alimentarias que contienen proteínas representan cargas elevadas de LNAA y por consiguiente puede esperarse que reduzcan el efecto de los productos con ratios triptófano/LNAA altas. Una posible explicación de este inesperado fenómeno es que los productos alimentarios usuales incorporan proteínas intactas en lugar de proteínas extensamente hidrolizadas. La mayor parte de los péptidos que incorporan triptófano y tirosina de la composición preferida de péptidos que comprenden triptófano tienen un peso molecular inferior a 500 Da. Teniendo en cuenta el peso molecular muy alto del triptófano (MW = 186) y la tirosina (MW = 163) y el hecho de que sólo están presentes niveles muy bajos de triptófano libre, la implicación es que la mayoría de estos péptidos serán tri- o di-péptidos.

En una modalidad preferida, la lisozima, preferiblemente lisozima de huevo de gallina, se (pre-)hidroliza enzimáticamente en un proceso industrial, es decir la lisozima (de huevo de gallina) se proporciona preferiblemente en la forma de un hidrolizado o un hidrolizado enriquecido. Ofrecidos en la forma de un hidrolizado (enriquecido) de este tipo, la absorción intestinal de los péptidos que contienen triptófano se facilita notablemente. En otra realización de la presente solicitud, la lisozima de huevo de gallina se convierte en un hidrolizado o hidrolizado enriquecido que comprende una población de péptidos que comprenden triptófano de la cual más del 50%, preferiblemente más del 70%, más preferiblemente más de 75% de los péptidos presentes tienen un peso molecular inferior a 500 Da. Preferiblemente, dicho hidrolizado (enriquecido) no contiene más de 1% en peso (sobre materia seca) de triptófano libre. El análisis de pesos moleculares de los péptidos que comprenden triptófano presentes en el hidrolizado se lleva a cabo como se describe en la sección Materiales & Métodos.

Adicionalmente, puede preferirse que para la composición de péptidos que comprenden triptófano utilizada preferiblemente en la formulación de la presente invención, el hidrolizado de lisozima (de huevo de gallina) se fraccione a fin de aumentar el contenido de triptófano de una fracción del hidrolizado. Esta fracción o hidrolizado enriquecido tiene preferiblemente una ratio triptófano/LNAA incrementada en comparación con el hidrolizado antes del fraccionamiento. El enriquecimiento del hidrolizado o hidrolizado enriquecido con triptófano libre adicional forma parte también de la presente invención. En una opción preferida para la preparación de un hidrolizado enriquecido de este tipo, se hace uso de la observación de que la lisozima incorpora una cantidad anormalmente alta de los residuos básicos arginina y lisina. Sorprendentemente, y como resultado de condiciones de incubación enzimática seleccionadas, es decir la elección de una endoproteasa que tiene una preferencia de escisión clara (tal como subtilisina) en combinación con condiciones de incubación que producen una cantidad elevada de di- y tri-péptidos que incorporan triptófano pero prácticamente nada de residuos arginina o lisina, puede producirse un hidrolizado de lisozima enriquecido de acuerdo con la invención. Así, los péptidos que contienen LNAA que incorporan residuos arginina o lisina

se pueden separar de los péptidos que contienen triptófano que no contienen tales residuos básicos. Por ejemplo, por ajuste del pH del hidrolizado a un valor entre 4 y 6, más preferiblemente entre 5,0 y 5,5, los péptidos sin dicho residuo básico no tendrán carga alguna y, por consiguiente, tendrán un carácter hidrófilo reducido. Estas características pueden utilizarse v.g. en un proceso cromatográfico o proceso de separación de otro tipo para separar selectivamente una gran proporción de los péptidos que contienen arginina o lisina. Como resultado, el contenido de péptidos que contienen triptófano se incrementa de modo espectacular y, opcionalmente, la ratio triptófano/LNAA de este hidrolizado enriquecido. Los péptidos cargados que incorporan arginina o lisina pueden separarse por técnicas conocidas tales como cromatografía iónica, cromatografía de interacción hidrófoba o electrodiálisis. Un antecedente práctico del uso de tales características en la separación cromatográfica de los péptidos relevantes puede encontrarse, entre otros lugares, en el texto Protein Purification Handbook (publicado por Amersham Pharmacia Biotech, actualmente GE Healthcare BioSciences, Diegem, Bélgica). En una ruta de purificación todavía más avanzada para preparaciones que combinan un contenido elevado de triptófano con una ratio triptófano/LNAA alta, se utiliza ventajosamente la presencia de aminoácidos con grupos laterales ácidos tales como glutamato (Glu) y aspartato (Asp) en lisozima. En este enfoque, el pH del hidrolizado de lisozima de acuerdo con la invención se ajusta primeramente a 3,0 y se cromatografía luego sobre una resina catiónica. A este valor de pH, los péptidos que incorporan un Glu o Asp pasarán a través de la columna, en tanto que otros péptidos quedarán fijados. Una elución subsiguiente con un tampón de pH 5 desorberá todos los péptidos fijados sin un residuo lisina o arginina como se ha descrito. La mayor parte de los péptidos que contienen triptófano se encontrará en esta fracción desorbida. Los péptidos fijados restantes pueden retirarse luego de la columna por elución con un tampón que tenga un pH aún más alto.

Aunque para la preparación de la composición de péptidos que comprenden triptófano utilizada preferiblemente en la formulación de la presente invención se utilizan con preferencia cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de interacción hidrófoba, están disponibles también otros métodos adecuados de separación cromatográfica que comprenden cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión de tamaños. La recuperación de los péptidos enriquecidos en triptófano de las fracciones acuosas resultantes puede hacerse por métodos que se conocen en la técnica. Con objeto de obtener productos concentrados y estables al almacenamiento, la recuperación incorpora preferiblemente un paso de evaporación y secado (por pulverización). También los procesos de nanofiltración y extracción que implican disolventes orgánicos seguidos por pasos de evaporación/precipitación presentan opciones para la purificación deseada. La recuperación de los péptidos enriquecidos en triptófano a partir de disolventes orgánicos se lleva a cabo preferiblemente por evaporación del disolvente.

A pesar del hecho de que la lisozima resulta ser sumamente resistente a la hidrólisis proteolítica en condiciones fisiológicas, es decir a un pH ácido que utiliza pepsina, tripsina y quimotripsina como proteasas, los hidrolizados de lisozima como se utilizan preferiblemente en la formulación de la presente invención pueden obtenerse también en tales condiciones ácidas menos favorables. Sin embargo, en dichas condiciones se requieren condiciones de incubación relativamente severas, tales como concentraciones mucho más altas de enzimas, temperaturas más altas y opcionalmente endoproteasas adicionales. Un hidrolizado de lisozima obtenido por incubación de lisozima a un pH alcalino con subtilisina se encontró particularmente rico en el dipéptido Ala-Trp (AW).

En la composición de acuerdo con la presente invención, la composición de péptidos que comprenden triptófano comprende preferiblemente una composición de péptidos que tiene una ratio triptófano a LNAA (en peso) de al menos 0,15, más preferiblemente 0,15-1,8, y preferiblemente dicha composición se obtiene por un proceso que comprende hidrolizar lisozima, más preferiblemente lisozima de huevos de gallina, para preparar un hidrolizado que tiene un DH entre 5 y 45, y opcionalmente separar parte de los péptidos que contienen arginina o lisina. En éste, la composición de péptidos que comprenden triptófano comprende preferiblemente AW o GNW, preferiblemente AW y GNW (donde la ratio molar de AW a GNW está comprendida preferiblemente entre 1 a 2 y 10 a 1, más preferiblemente entre 1 a 2 y 5 a 1), y dicha composición comprende adicionalmente una composición de glucosa disponible rápidamente (RAG) (que comprende preferiblemente uno o más de pululano que tiene un peso molecular medio numérico entre 1.000 y 45.000 daltons (preferiblemente 5.000-40.000 daltons), isomaltulosa, trehalosa, y/o mixturas de los mismos, muy preferiblemente isomaltulosa) y una composición de glucosa disponible lentamente (SAG) (que comprende preferiblemente uno o más de glucosa, sacarosa, maltodextrina, almidón, hidrolizado de almidón, dextrosa, y/o mixturas de los mismos), en donde la composición RAG y la composición SAG están presentes en la formulación en ratios en peso seco de: composición RAG: composición SAG entre 1:0,5 y 1:4, preferiblemente entre 1:0,8 y 1:3, más preferiblemente entre 1:1 y 1:3, y opcionalmente también la ratio en peso de los péptidos que contienen triptófano: composición RAG está comprendida entre 1:2 y 1:20, preferiblemente entre 1:3 y 1:15, más preferiblemente entre 1:3 y 1:8. En este caso, cuando la formulación está lista para consumo, se prefiere que la cantidad total de glucosa disponible rápidamente y glucosa disponible lentamente juntas sea 5 a 20% (en peso) de la formulación total lista para consumo, preferiblemente 7 a 15%. Se prefiere también en esta invención que la formulación de acuerdo con la presente invención comprenda 0,5 a 5% (preferiblemente 0,8 a 3%) de peso seco de la composición de péptidos que comprenden triptófano sobre producto listo para consumir. Son estas cantidades, ratios e intervalos los que se cree son beneficiosos a la vez para la absorción de triptófano y para la función cerebral, asimismo a lo largo de varias horas, y pueden conseguirse todavía.

En la formulación de acuerdo con la presente invención, puede preferirse que la preparación de péptidos que comprenden triptófano comprenda al menos dos péptidos diferentes seleccionados de di- o tri-péptidos, en donde dos

péptidos seleccionados de di- o triptéptidos están presentes cada uno en una cantidad de al menos 5% molar de la cantidad total de di- y triptéptidos, y en los cuales más de 30% molar de triptófano total está presente como triptófano combinado en péptidos, y preferiblemente más de 40% molar, más preferiblemente más de 50% molar, aún más preferiblemente más de 60% molar, todavía más preferiblemente más de 70% molar y muy preferiblemente más de 80% molar del triptófano combinado en péptidos está presente en la forma de un di- o un triptéptido, y preferiblemente la composición tiene una ratio triptófano/LNAA superior a 0,15, preferiblemente entre 0,15 y 1,8, y comprendiendo dicha composición adicionalmente una composición de glucosa disponible rápidamente (RAG) (que comprende preferiblemente uno o más de: pululano que tiene un peso molecular medio numérico entre 1.000 y 45.000 daltons (preferiblemente 5.000-40.000 daltons), isomaltulosa, trehalosa, y/o mixturas de los mismos, muy preferiblemente isomaltulosa) y una composición de glucosa disponible lentamente (SAG) (preferiblemente uno o más de glucosa, sacarosa, maltodextrina, almidón, hidrolizado de almidón, dextrosa, y/o mixturas de los mismos), en donde la composición RAG y la composición SAG están presentes en la formulación en ratios de peso seco de: composición RAG: composición SAG entre 1:0,5 y 1:4, preferiblemente entre 1:0,8 y 1:3, más preferiblemente entre 1:1 y 1:3, y opcionalmente también la ratio en peso de los péptidos que contienen triptófano: composición RAG está comprendida entre 1:2 y 1:20, preferiblemente entre 1:3 y 1:15, más preferiblemente entre 1:3 y 1:8. En este caso, cuando la formulación está lista para consumo se prefiere que la cantidad total de glucosa disponible rápidamente y glucosa disponible lentamente juntas sea 5 a 20% (en peso) de la formulación total lista para consumo, preferiblemente 7 a 15%. Se prefiere también en esta memoria que la formulación de acuerdo con la presente invención comprenda 0,5 a 5% (preferiblemente 0,8 a 3%) de peso seco de la composición de péptidos que comprenden triptófano sobre producto listo para consumir. Son estas cantidades, ratios e intervalos los que se cree son beneficiosos a la vez para la absorción de triptófano y para la función cerebral, asimismo a lo largo de varias horas, y pueden conseguirse todavía.

La invención se refiere adicionalmente a una formulación en la cual se prefiere que la misma comprenda 0,5 a 5% (preferiblemente 0,8 a 3%) de peso seco de la composición de péptidos que comprenden triptófano sobre producto listo para consumir.

La invención se refiere adicionalmente a un alimento, comida para mascotas, pienso, suplemento dietético o composición neutracéutica que comprende la formulación como se describe en esta memoria. Tales productos pueden encontrarse v.g. en la forma de un líquido listo para beber. Tales productos pueden comprender típicamente 1-20%, más preferiblemente 2-15%, en peso de una formulación (a saber, que comprende los péptidos, RAG y SAG) de acuerdo con la presente invención.

#### Materiales y Métodos

##### 35 Materiales

La subtilisina, bajo el nombre comercial de "Protex 6L" se obtuvo de Genencor (Leiden, Países Bajos), la pepsina de Sigma y la mixtura de tripsina/quimotripsina (Porcine PEM) de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). La lisozima se obtuvo como Delvozyme L (22% de materia seca) de DSM Food Specialities (Delft, Países Bajos).

##### 40 SDS-PAGE

La pureza de las preparaciones de lisozima utilizadas se comparó por SDS-PAGE. Todos los materiales utilizados para SDS-PAGE y tinción se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.). Las muestras se prepararon utilizando tampón SDS de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes y se separaron en geles Bis-Tris al 12% utilizando el sistema de tampones MES-SDS de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La tinción se realizó utilizando Simply Blue Safe Stain (Collodial Coomassie G250). Antes de la hidrólisis, la lisozima aparecía como una sola banda con un peso molecular de aprox. 14 kDa en el gel.

##### Análisis LC/MS/MS

Se utilizó HPLC utilizando un espectrómetro de masas con trampa iónica (Thermo Electron, Breda, Países Bajos) acoplado a una bomba P4000 (Thermo Electron, Breda, Países Bajos) para determinar la presencia de péptidos que contenían triptófano (principalmente di- y triptéptidos) en los hidrolizados enzimáticos de proteínas producidos por el proceso de acuerdo con la invención. Los péptidos formados se separaron utilizando una columna Inertsil 3 ODS 3, 3 µm, 150 \* 2,1 mm (Varian Belgium, Bélgica) en combinación con un gradiente de 0,1% ácido fórmico en agua Milli Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.; solución A) y 0,1% ácido fórmico en acetonitrilo (solución B) para elución. El gradiente comenzó con 100% de Solución A, se mantuvo en dichas condiciones durante 10 minutos, aumentando linealmente hasta 20% B en 25 minutos y volviendo inmediatamente a las condiciones iniciales, manteniéndose así durante 15 minutos para estabilización. El volumen de inyección utilizado era 50 microlitros, el caudal era 200 microlitros por minuto y la temperatura de la columna se mantuvo a 55°C. La concentración de proteínas de la muestra inyectada era aproximadamente 50 microgramos/mililitro. La identificación de los péptidos de interés se basó en el tiempo de retención, molécula protonizada y utilización de MS/MS específica para los péptidos de interés, utilizando energía de colisión óptima de aproximadamente 30%. La cuantificación de los péptidos específicos que contienen triptófano se realiza utilizando un método de estándar externo.

Se utilizó el tetrapéptido VVPP (M = 410,2) para ajustar la sensibilidad óptima en el modo MS y para fragmentación óptima en el modo MS/MS, realizando una infusión constante de 5 µg/ml, que dio como resultado una molécula

protonizada en modo MS, y una energía de colisión óptima de aproximadamente 30% en modo MS/MS, generando una serie de iones B e Y.

5 Antes de la LC/MS/MS, los hidrolizados enzimáticos de proteínas se centrifugaron a la temperatura ambiente y 13.000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante se diluyó 1:100 con agua desmineralizada filtrada a través de equipo de filtración de agua Millipore (agua Milli Q).

#### Grado de Hidrólisis

10 El Grado de Hidrólisis (DH) se obtuvo durante la incubación con las diversas mezclas proteolíticas se monitorizó utilizando un test OPA rápido (Nielsen, P.M.; Petersen, D.; Dambmann, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science* 2001, 66, 642-646).

#### Nitrógeno Kjeldahl

15 El Nitrógeno Kjeldahl total se midió por Análisis de Inyección de Flujo. Utilizando un Sistema de Inyección de Flujo Tecator FIASTAR 5000, equipado con una casete TKN Method 5000-040, una computadora Pentium 4 con Software SOFIA y un Tomamuestras Automático Tecator 5027, se cuantificó a 590 nm el amoníaco liberado por las soluciones que contenían proteínas. Una cantidad de muestra correspondiente al intervalo dinámico del método (0,5-20 mg N/l) se puso en el tubo de digestión junto con ácido sulfúrico de 95-97% y una Kjeltab sometida a un programa de digestión de 30 minutos a 200°C seguido por 90 minutos a 360°C. Después de inyección en el sistema FIASTAR 5000, se mide el pico de nitrógeno, a partir del cual puede deducirse la cantidad de proteína medida.

#### Distribución de pesos moleculares de los péptidos y proteínas presentes en los hidrolizados

25 El análisis de la distribución de tamaños de los péptidos de las muestras de proteínas tratadas con proteasa se realizó en un sistema HPLC automático equipado con una bomba de alta presión, un dispositivo de inyección capaz de inyectar muestras de 10-100 microlitros y un detector UV capaz de monitorizar el efluente de la columna a 214 nm.

30 La columna utilizada para este análisis era una Superdex Peptide HR 10/300 GL (Amersham) equilibrada con tampón de fosfato de sodio 20 mM/cloruro de sodio 250 mM, de pH 7,0. Después de inyectar una muestra (típicamente 50 microlitros) los diversos componentes se eluyeron de la columna con tampón en 90 min a un caudal de 0,5 ml/min. El sistema se calibró utilizando una mezcla de citocromo C (Mw 13500 Da), aprotinina (Mw 6510 Da) y tetra-glicina (Mw 246 Da) como marcadores de peso molecular.

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención.

## 35 EJEMPLOS

### Ejemplo 1

#### **Hidrólisis de lisozima utilizando Protex e identidad de los péptidos formados**

Una solución que contenía 10% (p/p) de lisozima pura se ajustó a pH 8,2 utilizando NaOH y se calentó a 52°C. La hidrólisis se inició por adición de 25 microlitros de Protex/g de proteína presente. Bajo agitación continua y manteniendo el pH a 8,2, se continuó la hidrólisis durante 5,5 horas para producir una solución prácticamente clara sin precipitado visible alguno. Después de un paso de calentamiento para desactivar la actividad de Protex, se tomó una muestra para análisis del DH. El DH de la solución resultó ser prácticamente 30%. La solución tratada en caliente se sometió a ultrafiltración sobre un filtro de 10 kDa para producir un líquido completamente claro. Este líquido claro se utilizó para análisis LC/MS, para distribución de pesos moleculares de los péptidos y proteínas presentes así como para cromatografía de intercambio iónico. Para obtener una impresión de la distribución de pesos moleculares de los péptidos y proteínas presentes, el líquido claro se sometió a un análisis de tamaño molecular como se describe en la sección Materiales & Métodos. Los resultados obtenidos indican claramente que prácticamente la totalidad de los péptidos que incorporan aminoácidos con una cadena lateral aromática (es decir triptófano, tirosina y fenilalanina) tienen un peso molecular inferior a 500 kDa. Teniendo en cuenta el alto peso molecular de estos aminoácidos, la implicación es que la mayoría de estos pequeños péptidos son tri- o dipéptidos.

55 El análisis LC/MS se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección Materiales & Métodos. Por selección de aquellos péptidos que contenían triptófano ("W"), pudieron detectarse los péptidos AW, GNW, WIR, NAW, WVA, VAW, AWR, SLGNW y cantidades menores de WW y SRWW. Se estableció que el nivel de triptófano libre en el hidrolizado después de incubación representaba menos de 1% del triptófano total (lisozima) presente.

60 Dado que los di- y tripéptidos son absorbidos fácilmente por los transportadores de péptidos presentes en la pared intestinal, hay pocas dudas de que los residuos triptófano presentes en tales péptidos serán absorbidos rápidamente y conducirán a niveles incrementados de triptófano en plasma después de la ingestión oral del hidrolizado de lisozima presente.

### Ejemplo 2

#### **Aumento del contenido de triptófano del hidrolizado**

65 La lisozima incorpora una cantidad sorprendentemente alta de los residuos básicos arginina y lisina. Adicionalmente, la molécula de lisozima incorpora un número significativo de los residuos ácidos glutamato y aspartato. Estos datos

se han utilizado para idear una ruta de purificación innovadora y elegante para hidrolizados que caracterizan ratios triptófano/LNAA altas. Un requisito esencial para esta ruta de purificación es, sin embargo, que sólo muy pocos de los residuos triptófano que aparecen en los péptidos contengan también un residuo arginina o lisina o un residuo glutamato o aspartato. Como se muestra en el Ejemplo 1, la ruta de hidrólisis específica utilizada aquí proporciona

5 sólo pocos péptidos que contienen triptófano que contengan un residuo arginina y ningún péptido que contenga un residuo lisina, glutamato o aspartato.

La teoría predice que una diferencia máxima de carga entre péptidos con y sin un residuo glutamato o aspartato puede alcanzarse alrededor de pH 3. Una diferencia máxima de carga entre péptidos con y sin un residuo arginina o lisina puede conseguirse a un pH de aproximadamente 5.

10

Para ilustrar el poder selectivo de este método, se preparó un hidrolizado de lisozima de acuerdo con el procedimiento especificado en el Ejemplo 1. A continuación, se ajustó el pH del hidrolizado a pH 3,1 utilizando ácido acético y se aplicaron aproximadamente 0,5 gramos de proteína a un volumen de lecho de 15 ml de una columna SP Sepharose FF (GE Healthcare, Diegem, Bélgica) equilibrada con citrato de sodio 20 mm, de pH 3,1. Después de lavar la columna con un volumen de columna del tampón de citrato de sodio para eliminar la mayor parte de los péptidos que incorporaban un glutamato o aspartato, se cambió el tampón de elución a un tampón de citrato de sodio 20mm de pH 5,1. Durante el lavado de la columna con tres volúmenes de columna del último tampón, se eluyeron una gama de péptidos que contenían triptófano. De acuerdo con el análisis LC/MS, estaba presente en grandes cantidades el dipéptido AW así como los tripéptidos GNW, NAW, WVA, VAW y una pequeña cantidad del pentapéptido SLGNW. El análisis de aminoácidos de las diversas fracciones a pH 5,1 demostró que el agrupamiento selectivo proporcionaba una solución que tenía una ratio molecular triptófano/LNAA de 1,75 y un rendimiento en triptófano de casi 30%. Un agrupamiento menos selectivo proporcionaba una solución con una ratio molecular Trp/LNAA de 0,4 y un rendimiento en triptófano de 70%. Subsiguientemente, la columna se lavó con 3 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM de pH 7,1. De acuerdo con los datos LC/MS, este paso eluía los péptidos que contenían arginina WIR, AWIR y, sorprendentemente, el péptido WW. Un lavado final de la columna con 1 M de NaOH, agua y 1 M de ácido acético preparó la columna para una operación siguiente.

15  
20  
25

**Ejemplo 3**

**Hidrólisis de lisozima en gran escala**

En procedimientos de hidrólisis de lisozima en mayor escala, se siguió esencialmente el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, con algunas modificaciones de menor importancia. Una solución que contenía 7,3% (p/p) de lisozima pura se calentó a 65°C, después de lo cual se ajustó el pH a 8,2 utilizando NaOH. La hidrólisis se inició por adición de 25 microlitros de Protex 6L/g de materia seca. Bajo agitación continua y manteniendo el pH a 8,2 y la temperatura a 53°C, se continuó la hidrólisis durante 2 horas. Después de ello se aumentó el valor de pH a 9,0 y se prosiguió la incubación durante 3,5 horas más para producir una solución con algo de precipitado. Se redujo luego el pH de la solución a 4,5 y la solución se enfrió hasta por debajo de 4°C. Para obtener un producto completamente claro, se filtró el líquido sobre un filtro Z 2000 (Pall) y el exceso de agua y sal se eliminó subsiguientemente por nanofiltración. El concentrado resultante se sometió luego a un tratamiento UHT de 7 segundos a 120°C, se evaporó y finalmente se secó por pulverización para obtener el hidrolizado de lisozima en forma seca. El producto así obtenido tiene una ratio molar triptófano/LNAA de aproximadamente 0,19.

30  
35  
40

**Ejemplo 4**

Se preparó una composición peptídica que comprendía péptidos con triptófano conforme a las líneas expuestas en el Ejemplo 3. El producto obtenido era un líquido acuoso que tenía un nivel de péptidos de aproximadamente 83%, un contenido de triptófano combinado en péptidos de aproximadamente 5,5%, y que tenía una ratio TRP/LNAA de aproximadamente 0,19. Dicho producto tenía el aspecto de un polvo amarillo claro, y dio, después de disolución al 1% en agua, una solución que tenía un pH de aproximadamente 4,3.

45

Con la preparación de péptidos anterior pudieron prepararse bebidas que tenían la composición que se indica en la Tabla 1 siguiente (% de peso seco de los ingredientes en la base acuosa; el resto puede ser agua). Un proceso para preparar estas composiciones puede ser:

50

- preparar una pre-mezcla de todos los ingredientes en agua,
- agitar dicha premezcla durante 10 minutos, y ajustar el pH hacia el final de la agitación, en caso deseado,
- opcionalmente, homogenizar mediante un homogenizador de alta presión.

55

Tabla 1.

	Ejemplo 4a	Ejemplo 4b
Preparación de péptidos que contienen triptófano (% p)	1,14	1,14
Leche desnatada en polvo (%)	2,1	2,1

## ES 2 392 921 T3

Carragenano (% p)	0,02	0,02
Maltodextrina (% p)	1,0	1,0
Sacarosa (% p)	4,6	4,6
Isomaltulosa (% p)	6	10

## REIVINDICACIONES

- 1.- Formulaci3n que comprende al menos dos p3ptidos que contienen tript3fano diferentes y solubles en agua que tienen 2 a 30 amino3cidos, y en donde la ratio tript3fano/amino3cidos neutros grandes (leucina, isoleucina, valina, tirosina, y fenilalanina) (LNAA) de la formulaci3n es al menos 0,15, preferiblemente entre 0,15 y 1,8, composici3n que comprende adicionalmente una composici3n de glucosa disponible r3pidamente (RAG) y una composici3n de glucosa disponible lentamente (SAG), en donde la composici3n RAG y la composici3n SAG est3n presentes en la formulaci3n en ratios en peso seco de: composici3n RAG: composici3n SAG entre 1:0,5 y 1:4, preferiblemente entre 1:0,8 y 1:3, y m3s preferiblemente entre 1:1 y 1:3.
- 2.- Formulaci3n de acuerdo con la reivindicaci3n 1, en donde la ratio en peso de la composici3n p3ptidos que contienen tript3fano: RAG es entre 1:2 y 1:20, preferiblemente entre 1:3 y 1:15, m3s preferiblemente entre 1:3 y 1:8.
- 3.- Formulaci3n de acuerdo con la reivindicaci3n 1, que comprende los p3ptidos AW o GNW, preferiblemente AW y GNW.
- 4.- Formulaci3n de acuerdo con la reivindicaci3n 3, en donde la ratio molar de AW a GNW est3 comprendida entre 1 a 2 y 10 a 1, preferiblemente entre 1 a 2 y 5 a 1.
- 5.- Formulaci3n que comprende al menos dos p3ptidos diferentes seleccionados de di- o trip3ptidos, en donde dos p3ptidos seleccionados de di- o trip3ptidos est3n presentes cada uno en una cantidad de al menos 5% molar de la cantidad total de di- y trip3ptidos, y en la cual m3s del 30% molar de tript3fano total est3 presente como tript3fano combinado en p3ptidos, y preferiblemente m3s de 40% molar, m3s preferiblemente m3s de 50% molar, a3n m3s preferiblemente m3s de 60% molar, todav3a m3s preferiblemente m3s de 70% molar y muy preferiblemente m3s de 80% molar del tript3fano combinado en p3ptidos est3 presente en la forma de un di- o un trip3ptido; teniendo preferiblemente la formulaci3n una ratio tript3fano/LNAA mayor que 0,15, preferiblemente entre 0,15 y 1,8, formulaci3n que comprende adicionalmente una composici3n de glucosa disponible r3pidamente (RAG) y una composici3n de glucosa disponible lentamente (SAG); en donde la composici3n RAG y la composici3n SAG est3n presentes en la formulaci3n en ratios en peso seco de: composici3n RAG: composici3n SAG entre 1:0,5 y 1:4, preferiblemente entre 1:08 y 1:3, y m3s preferiblemente entre 1:1 y 1:3.
- 6.- Formulaci3n de acuerdo con la reivindicaci3n 5, en donde la ratio en peso de los p3ptidos que contienen tript3fano:composici3n RAG est3 comprendida entre 1:2 y 1:20, preferiblemente entre 1:3 y 1:15, m3s preferiblemente entre 1:3 y 1:8.
- 7.- Formulaci3n de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde los p3ptidos que contienen tript3fano se obtienen por hidr3lisis de lisozima, preferiblemente una lisozima de huevo de gallina.
- 8.- Formulaci3n de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composici3n de glucosa disponible lentamente (SAG) comprende uno o m3s de: pululano que tiene un peso molecular medio num3rico comprendido entre 1.000 y 45.000 daltons, preferiblemente 5.000-40.000 daltons, isomaltulosa, trehalosa, y/o mixturas de los mismos.
- 9.- Formulaci3n de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la composici3n de glucosa disponible r3pidamente (RAG) comprende uno o m3s de glucosa, sacarosa, maltodextrina, almid3n, hidrolizado de almid3n, dextrosa, y/o mixturas de los mismos.
- 10.- Formulaci3n de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la misma est3 lista para consumo y en donde la cantidad total de glucosa disponible r3pidamente y glucosa disponible lentamente juntas es 5 a 20% en peso de la formulaci3n total lista para consumo, preferiblemente 7 a 15%.
- 11.- Formulaci3n de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la misma comprende 0,5 a 5%, preferiblemente 0,8 a 3% de peso seco de la composici3n de p3ptidos que comprenden tript3fano sobre producto listo para consumir.
- 12.- Uso de una formulaci3n de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para producir un alimento, comida para mascotas, pienso, bebida, suplemento diet3tico o composici3n nutrac3utica.
- 13.- Uso de acuerdo con la reivindicaci3n 11 en un l3quido listo para beber.
- 14.- Uso de una formulaci3n de acuerdo con la reivindicaci3n 12 3 13 en donde el alimento, comida para mascotas, pienso, bebida, suplemento diet3tico o composici3n nutrac3utica comprende 1-20% en peso de la formulaci3n.