

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 479 991**

51 Int. Cl.:

**C07C 391/00** (2006.01)

**C07D 233/76** (2006.01)

**A23L 1/305** (2006.01)

**A61K 31/198** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2006 E 06786713 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 1902020**

54 Título: **Derivados de seleno-aminoácidos**

30 Prioridad:

**14.07.2005 US 181264**

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

**25.07.2014**

73 Titular/es:

**ZINPRO CORPORATION (100.0%)  
10400 VIKING DRIVE, SUITE 240  
EDEN PRAIRIE, MN 55344-7232, US**

72 Inventor/es:

**ABDEL-MONEM, MAHMOUD M. y  
ANDERSON, MICHAEL D.**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 479 991 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

Derivados de seleno-aminoácidos

## 5 Antecedentes de la invención

El papel esencial del selenio en la nutrición fue reconocido primero por Schwarz y Foltz en 1957 (Schwarz, K. y Foltz, C.M., Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 79:3292 (1957)). Estos investigadores observaron que las ratas desarrollaban necrosis en el hígado cuando se alimentaban con una dieta purificada deficiente en vitamina E. Sin embargo, la adición de selenio a la dieta prevenía el desarrollo de esta afección. La habilidad del selenio dietético de prevenir el desarrollo de la diatesis exudativa, una afección caracterizada por la fuga del plasma hacia el interior de los espacios subcutáneos del abdomen y el pecho en pollos, se reportó en el mismo año por Patterson y otros (Patterson, E.L., Milstrey, R., Stokstad, E.L.R. Effect of selenium in preventing exudative diathesis in chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95: 617-620 (1957)). El importante papel del selenio en la nutrición se demostró más aun por el reconocimiento del efecto práctico de la deficiencia de selenio en el ganado (Muth, O.H., Oldfield, J.E., Remmert, L.F., y Schubert, J.R. Effects of selenium and vitamin E on white muscle disease. *Science* 128: 1090 (1958) y Hartley, W.J., y Grant, A.B. A review of selenium responsive diseases of New Zealand livestock. *Fed. Proc.* 20: 679 (1961)). Trabajos posteriores confirmaron que el selenio es un elemento esencial para los animales y que su deficiencia trae como resultado diversos trastornos (Combs, G.F. Jr., Combs, S.B. *The role of selenium in nutrition.* Academic Press, Orlando, Florida, pp 265-399 (1986b)).

La importancia del selenio en la nutrición humana y los efectos de su deficiencia en la salud humana no se reconocieron hasta los 1970s. Se encontró que la deficiencia de selenio era uno de los factores responsables de la enfermedad de Keshan, una afección humana caracterizada por una cardiomiopatía dilatada que afecta a personas que viven en las áreas rurales de China. La incidencia de la enfermedad de Keshan coincide con la distribución de las áreas deficientes de selenio. (Grupo de investigación de la enfermedad de Keshan de la Academia China de Ciencias Médicas. Epidemiologic studies on the etiologic relationship of selenium and Keshan disease. *Chin. Med J.* 92:477-482 (1979)). Además, un estudio prospectivo controlado por placebo demostró que nuevos casos de la enfermedad podían prevenirse por la administración de tabletas de selenio sódico (Grupo de investigación de la enfermedad de Keshan de la Academia China de Ciencias Médicas. Observation on effect of sodium selenite in prevention of Keshan disease. *Chin. Med J.* 92: 471-477 (1979)). Los efectos perjudiciales de la deficiencia de selenio inducida por la dieta en pacientes gravemente enfermos se reportaron en varios casos estudiados. La miopatía esquelética se desarrolló en un paciente con nutrición totalmente parenteral y se revirtió por la administración intravenosa de selenometionina. (van Rij, A.M., Thomson, C.D., McKenzie, J.M., Robinson, M.F. Selenium deficiency in total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 2076-2085 (1979)). La cardiomiopatía fatal inducida por la deficiencia nutricional de selenio se reportó en un hombre de 43 años que recibió alimentación parenteral durante 2 años antes de su muerte (Johnson, R.A., Baker, S.S., Fallon, J.T., Maynard, E.P., Ruskin, J.N., Wen, Z., Ge, K., y Cohen, H.J. An occidental case of cardiomyopathy and selenium deficiency. *The New England Journal of Medicine.* 304: 1210-1212 (1981)). En 1982, se reportó un segundo caso de cardiomiopatía fatal asociada con deficiencia de selenio dietético en un paciente con nutrición parenteral en el hogar por al menos dos años (Selenium Deficiency and Fatal Cardiomyopathy in a Patient on Home Parenteral Nutrition. *Gastroenterology.* 83:689-693 (1982)).

El reconocimiento del papel esencial del selenio en la nutrición humana y animal trajo como resultado el establecimiento de una Cantidad Diaria Recomendada (RDA) para los humanos y la aprobación de la inclusión de compuestos de selenio adicionales en la alimentación animal. Recientemente, el Consejo de Alimento y Nutrición del Instituto de Medicina corrigió la RDA para el selenio a 55 µg (Dietary Preference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, D. C.: National Academy Press, (2000)). En 1974, la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) aprobó el selenito sódico y el seleniato sódico como aditivos alimentarios. Estas sales inorgánicas de selenio se pueden adicionar al nivel de 0.3 ppm Se en la materia seca alimentaria. En Junio del 2000, la FDA aprobó el uso de levadura de selenio en pollos de engorde y dietas en capas.

El mecanismo bioquímico involucrado en la manifestación de los efectos beneficiosos del selenio comenzó a emerger en 1973 cuando se encontró que el selenio era un componente esencial de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G.F., y Hockstra, W.G. Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. *Science*, 179: 588-590 (1973) y Flohe, L., Gunzler, W.A. y Shock, H.H. Glutathione Peroxidase. A Selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32: 132-134)). Concurrentemente, se descubrió una selenoproteína extra (Selenoproteína P) en el plasma de ratas, monos rhesus y humanos y se encontró que era diferente de la glutatión peroxidasa (Moschos M.P. Selenoprotein P. *Cellular y Molecular Life Sciences.* 57: 1836-1845 (2000)). Otra función del selenio es como un componente catalíticamente activo de las enzimas yodotironina deiodinasas que regulan el metabolismo de la hormona tiroidea. Más recientemente, la selenocisteína se identificó en el centro activo de la tioredoxina reductasa lo que demostró el papel que juega el selenio en diversos procesos metabólicos catalizados por estas enzimas.

Estudios recientes mostraron que el papel del selenio en mamíferos no se limita a las funciones fisiológicas de las selenoenzimas. Ahora parece que el selenio tiene un papel muy específico en la espermatogénesis, que es esencial

para la fertilidad masculina (Ursini F., Heim S., Kiess M., Maiorino M., Roveri A., Wissing J., Flohe' L. Dual Function of the Selenoprotein PHGPx During Spermi Maturation. *Science* 285: 1393-1396 (1999)). La identificación de una selenoenzima específica en los núcleos de los espermatozoides subrayó aún más el importante papel que juega el selenio en la maduración de los espermatozoides (Pfeifer H., Conrad M., Roethlein D., Kyriakopoulos A., Brielmeier M., Bornkamm G.W., Behne D. Identification of a Specific Spenn Nuclei Selenoenzyme Necessary for Protamine Thiol Cross-Linking During Spenn Maturation. *FASEB J* 15:1236-1238 (2001)).

Los requerimientos dietéticos de selenio usualmente se satisfacen mediante la ingestión de dietas que contienen compuestos de selenio orgánico de origen natural. Los alimentos e ingredientes alimentarios ricos en compuestos de selenio orgánico incluyen la carne, el pescado, productos lácteos, algunos vegetales y granos. La concentración de selenio en materiales de origen vegetal a menudo depende de la concentración de selenio en el suelo donde se cultivaron las plantas. El suelo de las Montañas Rocosas contiene niveles de selenio más altos que otros estados y las plantas que se cultivan en estos suelos contienen niveles de selenio más altos. La mayoría del selenio orgánico en alimentos e ingredientes de alimentación naturales está presente como L-selenometionina. Algunas plantas y vegetales acumuladores tales como ajo, cebollas y brócoli que se cultivan en suelos ricos en selenio contienen selenocisteína y sus derivados como los compuestos de selenio orgánico mayoritarios. Una de las formas predominantes de selenio en plantas de forraje nativas de los Estados Unidos es el seleniato. De 24 plantas estudiadas, el seleniato representó el 5-92% del selenio total. El selenito estaba ausente en todas menos una de estas plantas que contenía 3 % del selenio total como selenito. (Whanger P.D. Selenocompounds in Plants and Animals and their Biological Significance. *Journal of the American College of Nutrition*, 12: 223-232 (2002)). Independientemente de la forma en que se ingiere el selenio, este se transforma mediante una variedad de rutas metabólicas a través de la misma fuente intermediaria en las selenoproteínas específicas que contienen selenocisteínas que son responsables de los efectos biológicos del selenio. Los niveles de estas selenoproteínas que contienen selenocisteínas en los tejidos parecen controlarse homeostáticamente. La ingestión de selenio suplementario por encima de los requerimientos óptimos no parece aumentar las concentraciones de las selenoproteínas específicas en los tejidos. Sin embargo, la ingestión de selenometionina trae como resultado una retención más alta de selenio en los tejidos que aquella observada con otras fuentes de selenio. Esto se atribuye al hecho de que solamente una fracción de selenometionina se metaboliza de forma similar a otras fuentes de selenio a través de la fuente intermediaria a proteínas que contienen selenocisteínas específicas. Cierta porción de la selenometionina ingerida se incorpora no-específicamente directamente en las proteínas en lugar de la metionina. Este selenio enlazado no-específicamente se presenta en altas concentraciones en las proteínas ricas en metionina. La fracción de selenometionina ingerida que se incorpora en proteínas no específicas parece depender de la relación de selenometionina a metionina y no del estado del selenio. Cuando se ingieren dietas bajas en metionina, la incorporación no específica de selenometionina aumentada en las proteínas trae como resultado la disminución de las concentraciones y efectos de las selenoproteínas específicas. La incorporación no específica de selenometionina tiene lugar en las proteínas de los músculos esqueléticos, eritrocitos, páncreas, hígado, estómago, riñones y la mucosa gastrointestinal. La liberación de selenometionina a partir de las proteínas del cuerpo está unida al recambio de proteínas. Una concentración de selenometionina en estado estacionario en los tejidos se puede establecer si la ingesta de seleno-amino ácidos se mantiene por un período de tiempo prolongado. (Schrauzer G.N. Nutritional Selenium Supplements: Product Types, Quality, and Safety. *Journal of the American College of Nutrition*, 20: 1-4 (2001)).

La disposición de la selenometionina, Se-metil-selenocisteína, selenito, y seleniato en animales se ha estudiado cuidadosamente. Estas fuentes comunes de selenio en la nutrición animal toman diferentes rutas hacia la fuente de selenio intermediario que se incorpora finalmente en las seleno-proteínas específicas o adicionalmente se convierten en metabolitos polares que se pueden excretar fácilmente.

Una fracción de las fuentes de selenio ingerida se elimina a través de un número de rutas. Algo del selenito y el seleniato ingeridos oralmente se reduce en el tracto gastrointestinal a selenio elemental que se excreta en la materia fecal. El selenito y el seleniato además se excretan en la orina.

La suplementación de la alimentación animal con una fuente aprobada de selenio gana popularidad. Actualmente, las fuentes inorgánicas de selenio tales como el selenito y el seleniato así como la fuente orgánica levadura de selenio están aprobadas por la FDA como ingredientes alimentarios. Sin embargo, la cantidad de selenio que se puede añadir y las especies de ganado que se pueden suplementar están reguladas. La aprobación del uso de fuentes inorgánicas de selenio tales como el selenito y el seleniato como ingredientes alimentarios es curiosa ya que estos no ocurren de forma natural en concentraciones significativas en la alimentación. La L-selenometionina es la forma del selenio más comúnmente presente en alimentos y alimentación naturales. Sin embargo, la L-selenometionina sintética no está comercialmente disponible a precios razonables para el uso como ingrediente alimentario en la producción de ganado. Por lo tanto, la levadura enriquecida con selenio se ha usado como una fuente práctica económica de L-selenometionina. Cepas específicas de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas en un medio rico en selenio acumulan hasta 3000 µg Se por g de materia seca. La mayor parte del selenio en la levadura existe como L-selenometionina. La L-selenometionina está presente principalmente incorporada en la proteína de la levadura en lugar de la L-metionina. Otros compuestos de selenio orgánico pueden estar presentes en bajas concentraciones incluyendo Se-adenosil-selenohomocisteína (2-5%), selenocisteína (0.5%), metilselenocisteína (0.5%), selenocistationina (0.5%), y γ-glutamil-Se-metilselenocisteína (0.5%). Sólo trazas de selenio inorgánico pueden estar presentes en la levadura como selenito o

seleniato (Schrauzer G.N. selenometionina: A Review of its Nutritional Significance, Metabolism and Toxicity. J. Nutr. 130: 1653-1656 (2000)).

5 Durante los últimos años se publicaron varios estudios que compararon el efecto de suplementos de levadura de selenito y selenio en el estado del selenio y la salud del ganado. En animales deficientes de selenio, las concentraciones de selenio en el plasma y los tejidos aumentaron linealmente según aumentaba la ingesta de selenio hasta un punto después del cual las concentraciones de selenio del plasma y los tejidos no cambiaron significativamente con una ingesta aumentada. Por ejemplo la relación de las concentraciones de selenio dietético a partir de selenito sódico a selenio en el plasma y la leche en vacas lecheras se examinó por Maus y otros. La concentración de selenio en el plasma y la leche aumentaron linealmente según la ingesta de selenio aumentaba desde aproximadamente 2-6 mg/día. Aumentos adicionales en la ingesta resultaron en sólo pequeños cambios en el selenio en el plasma y la leche (Maus R.W., Martz F.A., Belyea R.L. y Weiss M.F., Relationship of Dietary Selenium to Selenium in Plasma and Milk from Dairy Cows, J Dairy Sci, 63: 532-537 (1980)).

15 Se encontró que el selenio estaba más biodisponible a partir de levadura de selenio que a partir de selenito o seleniato en varios estudios en animales. El aumento de la concentración de selenio en los tejidos fue mayor en animales alimentados con levadura de selenio en comparación con animales alimentados con selenito. Sin embargo, el aumento en la actividad de la glutatión peroxidasa fue aproximadamente el mismo independientemente de la fuente del selenio suplementario. Los efectos favorables de la suplementación de selenio en la salud animal se demostraron en varios estudios. Por ejemplo, la suplementación de selenio mejoró la salud de la ubre en las vacas lecheras según se demostró por una disminución en el porcentaje de cuartos que portaban patógenos de mastitis y una disminución en el conteo de células somáticas en la leche. Nuevamente los efectos de la levadura de selenio fueron mayores que los de selenito sódico (Malbe M., Klassen M., Fang W, Mylls V., Vikerpuur M., Nyholm K., Sankari S., Sourta K., y Sandholm M. Comparisons of selenite and selenium Yeast Feed Supplements on Se-incorporation, Mastitis and Leucocyte Function in Se-deficient Dairy Cows, J Vet Med A, 42: 111-121 (1995)).

30 En resumen, ahora está bien establecido que el selenio dietético es esencial para la salud y el bienestar de humanos y animales. Varios estudios han demostrado que el selenio está más biodisponible a partir de fuentes orgánicas que a partir de fuentes inorgánicas. La única fuente orgánica de selenio disponible para uso comercial es la preparación de levadura rica en selenio. En levadura, el selenio existe principalmente como proteínas ricas en L-selenometionina. Aunque la levadura de selenio ahora se acepta ampliamente como una fuente de selenio dietético, su uso sufre de varias limitaciones. La concentración del selenio unido orgánicamente en levadura está limitada por su habilidad para formar L-selenometionina a partir del medio enriquecido en selenito. Actualmente, la mayor concentración posible de selenio en levadura parece ser 2000 µg/g de materia seca. En segundo lugar, a partir de que el selenio unido orgánicamente en levadura se produce por un proceso biológico que es vulnerable a variaciones sutiles en el proceso de producción a gran escala, la composición exacta de los compuestos de selenio es variable y no se conoce con facilidad. Ocasionalmente, la levadura contiene concentraciones variables de compuestos de selenio inorgánico tales como selenitos y seleniatos. En tercer lugar, los compuestos de selenio orgánico están presentes en la levadura como parte de las proteínas intracelulares. Antes de que estos compuestos estén disponibles para la absorción después de ser ingeridos, las paredes celulares de las bacterias deben romperse para liberar la proteína dentro del tracto gastrointestinal de los animales donde puede someterse a los efectos proteolíticos de las enzimas digestivas. Es solamente después de que la proteína se hidroliza a amino ácidos simples o dipéptidos que los compuestos de selenio pueden absorberse. La liberación de los compuestos de selenio como amino ácidos simples o dipéptidos a partir de células de levadura intactas no es completa y es altamente dependiente de las condiciones en el tracto gastrointestinal. Debido a estas limitaciones, hay una necesidad importante de desarrollar alternativas a la levadura enriquecida en selenio que sirvan como una fuente dietética de selenio fácilmente biodisponible. Nuestra anterior patente, Estados Unidos 6,911,550, se refería a sales complejas. Esta mejora se refiere a ciertos ésteres y derivados orgánicos que son muy estables.

50 Recientemente, la demanda por una fuente dietética de selenio con una biodisponibilidad mejorada para su uso como un suplemento para humano y ganado ha aumentado. Los seleno-amino ácidos sintéticos recientemente se han vuelto comercialmente disponibles a un costo razonable. Estos amino ácidos sin embargo tienen baja solubilidad en agua y sus cristales tienen propiedades repelentes del agua que traen como resultado una baja velocidad de disolución. La baja solubilidad y la lenta velocidad de disolución disminuyen la biodisponibilidad de estos compuestos después de darlos como alimento a animales. Un objetivo primario de esta invención es identificar derivados de seleno-amino ácidos con biodisponibilidad mejorada y después prepararlos.

60 El azufre tipo selenio, es un miembro del grupo de los elementos VIA. Existe en diferentes formas alotrópicas y tiene estados de oxidación -2, 0, +2, +4, y +6. El selenio es un elemento no metálico. Puede formar aniones mono-atómicos y por lo tanto puede formar enlaces iónicos así como covalentes. En el estado de oxidación -2, el selenio forma enlaces covalentes con sustituyentes de carbono y puede frecuentemente reemplazar al azufre en compuestos de origen natural. El papel biológico del selenio se atribuye a estos compuestos de origen natural en los que el selenio existe en el estados de oxidación -2 y se une covalentemente, usualmente con carbono como parte de proteínas funcionales. Los seleno-amino ácidos se propusieron como fuentes dietéticas de selenio. Sin embargo, se reconoce que la biodisponibilidad de estos compuestos puede disminuir significativamente por el estado nutricional del animal y la composición de la dieta y

5 el contenido del tracto gastrointestinal. Por lo tanto era deseable explorar derivados de los seleno-amino ácidos que pudieran mejorar la biodisponibilidad de estos amino ácidos. En una patente previa (Patente de los Estados Unidos. 6,911,550) los inventores de la presente aplicación describieron derivados reversibles de seleno amino ácidos con biodisponibilidad mejorada. Estos derivados reversibles son 1:1 complejos de zinc de seleno amino ácidos tales como L-selenometionina. El objetivo primario de la presente invención es hacer nuevos derivados irreversibles de seleno-amino ácidos con biodisponibilidad mejorada. Estos nuevos compuestos se forman al modificar químicamente los selenoamino ácidos por la formación de enlaces covalentes entre el grupo -amino y/o el carboxilo y un grupo protector. Estos compuestos químicamente estables se modifican enzimáticamente al selenoamino ácido después de ingerirse por el animal.

10 Otro objetivo de la invención es describir métodos de preparación de estos derivados y sus usos como ingredientes alimentarios en el ganado.

15 Resumen de la invención

Se preparan nuevos derivados de selenoamino ácidos que son fuentes dietéticas efectivas de selenio suplementario en humanos y ganado. Los nuevos derivados tienen propiedades físicas, químicas o biológicas mejoradas con respecto al seleno-amino ácido parental. Estos derivados poseen biodisponibilidad mejorada y/o estabilidad aumentada de los seleno-amino ácidos.

20 De acuerdo con la presente invención se proporciona un seleno alfa amino ácido N-Succinil L-selenometionina y sales de este.

25 Descripción detallada de una modalidad preferida

Modalidad

Debido al desempeño no satisfactorio de las fuentes de selenio disponibles actualmente para su uso en suplementos alimentarios, fue necesario después explorar derivados de selenometionina que tienen biodisponibilidad mejorada. Las propiedades deseadas de los nuevos derivados incluyen:

1. El derivado debe ser una fuente fácilmente biodisponible de selenio.
2. El derivado debe ser más estable que el compuesto parental.
3. Las propiedades físicas del derivado tales como solubilidad, velocidad de disolución, olor son más favorables que las del compuesto parental.
- 35 4. El derivado puede prepararse fácilmente a partir de los compuestos parentales por medio del uso de reactivos disponibles comercialmente y a un costo razonable.
5. El derivado debe ser tan seguro como el compuesto parental reconociendo que todos los compuestos que contienen selenio tienen un intervalo estrecho de seguridad.
- 40 6. El derivado debe ser estable en el contenido del primer compartimento del estómago del rumiante de forma que puede usarse como fuente de selenio en animales rumiantes.

El grupo de derivados explorado son los derivados N-Succinil de los seleno-amino ácidos. Estos compuestos se obtuvieron fácilmente mediante la reacción de los seleno-amino ácidos con anhídrido succínico. Estos compuestos son ácidos parcialmente disociados porque el grupo -amino del seleno-amino está enmascarado. Estos compuestos se separan y se purifican fácilmente como sus sales. Las sales de potasio, sodio, calcio o magnesio se pueden preparar. La sal sódica de N-succinil L-selenometionina es fácilmente soluble en agua. Es significativamente más estable que la L-selenometionina en el estado sólido y en solución. Estos derivados tienen mucha mayor solubilidad en lípidos que los seleno-amino ácidos parentales y serán absorbidos rápidamente por difusión pasiva a partir de los contenidos intestinales a  $\text{pH} < 3.0$ .

Los compuestos descritos anteriormente son derivados reversibles de los seleno-amino ácidos. Después de la ingestión por el animal, se espera que se conviertan fácilmente en los seleno-amino ácidos parentales principalmente mediante reacciones catalizadas por enzimas. Los derivados N-Succinil probablemente se hidrolizan enzimáticamente por amidasas en el plasma y el hígado.

Los derivados de seleno-amino ácido descritos en esta invención se pueden añadir a la alimentación sólida o líquida como una fuente fácilmente disponible de selenio. La cantidad de compuesto añadida dependerá del animal que se suplementa. Para cerdos y aves, la dieta se suplementará mediante 0.05-2.00 ppm Se, preferentemente 0.1-0.3 ppm Se. Para el ganado, la alimentación se suplementará mediante 0.05-10 mg Se por cabeza por día, preferentemente 2-7mg Se por cabeza por día.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar los métodos prácticos de obtención de estos complejos, sus propiedades, y su uso como fuentes de selenio en la nutrición animal.

**EJEMPLO 1**

Preparación de N-succinil L-selenometionina (compuesto 1):

5 Un frasco de 3-cuellos de 250-ml de fondo redondo se equipó con un termómetro, un condensador de reflujo y un embudo adicional. Se colocó acetato de etilo (75 ml) dentro del frasco. El anhídrido succínico (12.404 g) se pulverizó finamente en un mortero y se añadió al acetato de etilo en el frasco. La mezcla se agitó mediante un agitador magnético hasta que todos los sólidos se disolvieron. Se adicionó L-selenometionina (19.630 g, 0.1 mole). Se diluyó ácido sulfúrico (1.0 ml de una solución obtenida mediante la dilución de 1 parte de ácido sulfúrico concentrado con 5 partes de agua).  
10 La mezcla se calentó bajo reflujo con agitación continua durante 1 hr. La solución clara caliente se filtró. Se formó un precipitado cristalino blanco a medida que el filtrado se enfriaba. El precipitado pesó 24.92g (84.14% de rendimiento).

El espectro FTIR de los cristales finamente molidos obtenidos anteriormente en una perla de bromuro de potasio mostró picos de absorción a aproximadamente: 3313.5(m), 3091.7(w), 2931.6(m), 2626.9(w), 1714.6(vs), 1647.1 (s), 1616.2(m), 1434.9(m), 1409.9(m), 1245.9(s), 1195.8(s), 964.3(w), 704.0(w) y 636.5(w)  $\text{cm}^{-1}$ . (w, débil; m, medio; s, fuerte; vs, muy fuerte). Este espectro es diferente del de la L-selenometionina que mostró picos de absorción a aproximadamente: 3433.1 (w), 2923.9(s), 2731.0(m), 2611.4(m), 2117.7(w), 1608.5(s), 1581.5(vs), 1512.1 (s), 1411.8(s), 1338.5(m), 1269.1 (w), 1218.9(w), 1153.4(w) y 540.0(w)  $\text{cm}^{-1}$ .  
15

20 Una solución que contenía 1mg/ml de N-Succinil L-selenometionina en agua se analizó mediante HPLC por medio del uso de un detector UV/Vis a 210nm y 20ul de la muestra se inyectaron en la columna por medio del uso de un Inyector en lazo de Rheodyne. Se usó una columna Discovery Cyano de 250 X 4.6 mm (Supelco) con 0.1% de ácido acético a 1 ml/min como la fase móvil. La N-succinil L-selenometionina tiene un tiempo de retención de 5.56 min. L-selenometionina tiene un tiempo de retención de 4.167 min en este sistema. Se obtuvo un solo pico que representa el 94.54% de la respuesta del detector con la N-succinil L-selenometionina. El sistema fue útil para la determinación de N-succinil L-selenometionina en premezclas.  
25

**EJEMPLO 2**

30 Comparación de los efectos del selenito sódico y la N-succinil l-selenometionina (compuesto 1) en el contenido de selenio en los tejidos y la actividad glutatión peroxidasa en sangre completa de vacas lactantes:

Se prepararon tres premezclas para usar en un estudio de campo en vacas lactantes. Una de las premezclas no contenía una fuente adicional de selenio y se pretendió que sirviera como placebo. La segunda contenía selenito sódico y la tercera contenía N-succinil - selenometionina (Compuesto 1). Cada una de las premezclas se prepararon mediante la mezcla de una cantidad de la fuente de selenio con cantidad suficiente de azúcar finamente molida para contener 250 ppm de selenio. Cada premezcla se identificó con un color mediante la incorporación de una solución de un color de alimentos durante la formulación y se le dio una letra de designación mediante selección al azar. Las premezclas se proporcionaron al nutricionista de animales a ciegas, es decir ellos no conocían la fuente de selenio de las premezclas.  
35 Esto se hizo para evitar cualquier posible sesgo en la interpretación de los resultados del experimento de alimentación.  
40

Treinta vacas lactantes se alimentaron con una de las tres premezclas como un suplemento diario. Se determinó el efecto de estas fuentes de selenio en el contenido de selenio en el tejido y la actividad glutatión peroxidasa en la sangre completa. Todas las vacas se alimentaron con una dieta mezclada total desprovista de selenio añadido por un período de reducción inicial de 8 semanas. Las raciones diarias se suplementaron con una cantidad de la premezcla para proporcionar 7.5mg selenio. Los tratamientos continuaron por 8 semanas seguido por un período de reducción de 4 semanas. Las muestras de leche se recogieron un día por semana comenzando la semana anterior al primer período de reducción (Semana 0) y continuando durante las 20 semanas del experimento. Se determinó el contenido de selenio del suero de leche obtenido después de que las muestras se desgrasaron. La concentración de selenio en el suero de leche para las semanas 0,8, 12,16 y 20 se informan en la tabla 1. Las muestras de sangre se recogieron un día por semana comenzando la semana anterior al primer período de reducción (Semana 0) y a intervalos de cuatro semanas durante el experimento (Semanas 8, 12, 16 y 20 en la tabla 1). Las muestras de sangre se extrajeron en tubos de vacío libres de oligoelementos que contenían anticoagulante. Las alícuotas de sangre completa se analizaron para selenio y actividad glutatión peroxidasa. Otras alícuotas de sangre se centrifugaron para recolectar el plasma y se determinó el contenido de selenio en el plasma. Se obtuvieron muestras de hígado por biopsia en un día por semana comenzando la semana anterior al primer período de reducción (Semana 0) y a intervalos de cuatro semanas durante el experimento (Semanas 8, 12, 16 y 20 en la tabla 1). Las muestras de hígado se analizaron para el contenido de selenio. Los resultados del experimento se informan en la tabla 1. Los resultados en la tabla 1 muestran que las concentraciones de selenio en el suero de leche, plasma e hígado después de 8 semanas de restricción de la ingesta de selenio (Sem 8) fueron significativamente más bajas que aquellas antes de comenzar el período de reducción (Sem 0). La alimentación de las vacas con una dieta mezclada que no contiene selenio suplementario (Placebo) trae como resultado un pequeño incremento en las concentraciones de selenio pero los niveles de base a la Sem 0 no se restauraron completamente. Sin embargo, la alimentación con una dieta suplementada con selenito sódico o N-succinil L-selenometionina (Compuesto 1) trajo como resultado un aumento progresivo y significativo en las concentraciones de selenio en estos tejidos (Sem 12 y Sem 16). Las concentraciones de selenio disminuyeron significativamente en todos los tejidos al final  
45  
50  
55  
60  
65

del segundo período de reducción (Sem 20). Los dramáticos cambios en las concentraciones de selenio en respuesta a los cambios en la ingesta dietética de selenio indican que estos tejidos son indicadores sensibles del estado del selenio dietético de las vacas lactantes. Es importante destacar que el Compuesto 1 causó aumentos estadísticamente significativos mayores que el selenito sódico en las concentraciones de selenio de estos tres tejidos lo que significa que la N-succinil L-selenometionina es una fuente más biodisponible de selenio dietético que el selenito sódico.

5

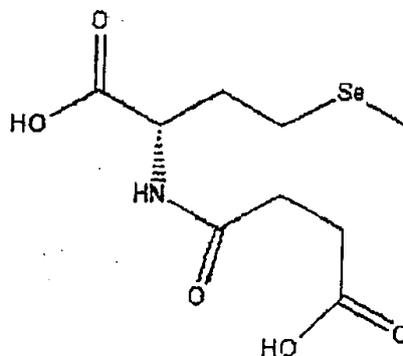
Los cambios en las concentraciones de selenio y la actividad glutatión peroxidasa (GPX) en sangre completa en respuesta a una ingesta variable de selenio dietético son menos sensible que aquellos en el suero de leche, plasma e hígado. Esto indica que estos parámetros no son indicadores útiles del estado del selenio de vacas lactantes.

10

TABLA 1

Tejido	Compuesto	Semana 0	Semana 8	Semana 12	Semana 16	Semana 20
Se en suero de la leche (ng/ml)	Placebo	13.55	4.37	9.27	7.26	10.94
	Selenito sódico	13.01	3.89	11.93	22.84	10.94
	Compuesto	14.96	4.30	25.18	30.37	10.91
Se en Plasma (ng/ml)	Placebo	72.1	47.1	31.3	28.9	42.7
	Selenito sódico	75.4	45.3	56.3	56.8	48.4
	Compuesto	63.5	43.6	60.3	65.7	52.2
Se en hígado (ng/g peso seco)	Placebo	1231	793	672	660	677
	Selenito sódico	1446	1034	1129	1185	934
	Compuesto	1151	690	1437	1705	1003
Se en sangre completa (ng/ml)	Placebo	133.3	145.9	99.0	92.6	81.4
	Selenito sódico	147.4	135.7	113.2	119.1	104.4
	Compuesto	144.0	136.3	139.0	136.8	112.1
GPX en sangre completa (EU/ml)	Placebo	17.3	19.0	17.1	14.0	15.0
	Selenito sódico	17.3	17.9	17.6	16.1	17.9
	Compuesto	18.2	19.2	18.7	17.5	19.8

Compuesto I



15

(S)-4-(1-carboxi-3-(metilselanil)propilamino)-4-ácido oxobutanoico N-Succinil L-Selenometionina

20

Como se usa en el término "derivados biológicamente activos" "significa compuestos orgánicos covalentemente unidos preparados a partir de la estructura básica (por ejemplo L-selenometionina) que retienen las propiedades de biodisponibilidad para proporcionar el enriquecimiento de selenio en la dieta de los animales.

**REIVINDICACIONES**

1. Una seleno alfa aminoácido N-succinil L-selenometionina y sales de esta.
- 5 2. Uso de un complejo de una seleno alfa aminoácido N-succinil L-selenometionina y sales de esta para la suplementación de selenio de una alimentación animal.
- 10 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2 en donde los animales se seleccionan a partir del grupo de cerdos y aves y la cantidad añadida está en un nivel de 0.05 a 2.0 ppm de selenio.
- 15 4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3 en donde la cantidad añadida está en un nivel de 0.1 a 0.3 ppm de selenio.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 2 en donde el animal es ganado domesticado y la cantidad añadida es desde 0.5 mg a 10 mg de selenio por cabeza por día.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5 en donde la cantidad añadida es desde 2 a 7 mg de selenio por cabeza por día.