

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 402**

51 Int. Cl.:

A61K 31/19 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 3/02 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2005 E 10186645 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2301529**

54 Título: **Composiciones de hidroximetilbutirato y usos de las mismas**

30 Prioridad:

26.03.2004 US 810762

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

14.10.2016

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064-3500, US**

72 Inventor/es:

**BAXTER, JEFFREY, H;
MUKERJI, PRADIP;
VOSS, ANNE, C y
TISDALE, MICHAEL J**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 586 402 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

Composiciones de hidroximetilbutirato y usos de las mismas

5 La presente invención se refiere a una composición para su uso en la prevención y tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas y cáncer. En la práctica de la presente invención se administra por vía enteral a los pacientes HMB solo o, como alternativa, en combinación con ácido eicosapentaenoico (20:5 ω -3), FOS, carnitina y mezclas de los mismos. El HMB se puede añadir a productos alimenticios que comprenden una fuente de amino-nitrógeno enriquecida con aminoácidos neutros grandes, tales como leucina, isoleucina, valina, tirosina, treonina y fenilalanina, y que carecen sustancialmente de aminoácidos libres.

Antecedentes

15 La pérdida de peso no deseada, en particular la pérdida de masa magra, es algo relativamente habitual en enfermedades crónicas y tiene un impacto significativo sobre la morbilidad y la mortalidad. Esto es particularmente cierto en pacientes con cáncer, donde tales pérdidas de masa pueden convertirse en algo limitante del tratamiento y, por lo tanto, afectar al pronóstico global.

20 La caquexia es un síndrome caracterizado por anorexia, pérdida de peso, saciedad prematura, astenia, pérdida de masa corporal magra y disfunción de varios órganos. Es una consecuencia frecuente de las enfermedades crónicas (tanto malignas como no malignas) y está asociada con un peor pronóstico en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la insuficiencia cardíaca crónica (ICC), la insuficiencia renal, el SIDA, la demencia, la enfermedad hepática crónica y el cáncer. A menudo es independiente de otros indicadores de la gravedad de la enfermedad. (Witte, K. K. A. y Clark, A. L.: Nutritional abnormalities contributing to cachexia in chronic illness, *International Journal of Cardiology* 85:23–31, 2002).

30 La enfermedad pulmonar a menudo se asocia con caquexia y un número importante de pacientes que sufren EPOC, especialmente enfisema, sufren emaciación durante el curso de la enfermedad. La pérdida de peso es un factor de riesgo independiente para el pronóstico y con frecuencia se asocia con un mayor consumo de oxígeno. Esto se ha relacionado con el desarrollo de un metabolismo energético muscular ineficiente (Kutsuzawa, T, et al.: Muscle energy metabolism and nutritional status in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152(2):647–652, 1995). La EPOC también se asocia con una respuesta inflamatoria sistémica elevada general, reflejada por concentraciones elevadas de citocinas proinflamatorias y proteínas de fase aguda en sangre periférica (Schols, A. M., et al: Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 51:819–824, 1996; Takabatake, N., et al.: Circulating leptin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1215–1219, 1999; Dentener, M. A., et al.: Systemic anti-inflammatory mediators in COPD: increase in soluble interleukin I receptor II during treatment of exacerbations. *Thorax* 56:721–726, 2001.) Estos cambios se asocian a menudo con síndromes de pérdida de masa muscular.

40 Los estudios con músculos incubados y extractos de músculo sugieren que la ruta de la ubiquitina-proteosoma dependiente de ATP es responsable de la mayor parte del aumento de la proteólisis que finalmente da lugar a pérdida de masa muscular. En particular, el aumento de los niveles de proteínas conjugadas con ubiquitina y el aumento de los niveles de ARNm de poliubiquitina, ciertas subunidades de proteosomas y la encima de conjugación a la ubiquitina E2_{de 14K} son características que se encuentran en la mayoría de los músculos que se atrofian (Schols, A. M. W. J.: Pulmonary cachexia. *Intl J Cardiology* 85:101–110, 2002; Jagoe, R. T. y Goldberg, A. L.: What do we really know about the ubiquitin–proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4:183–190.200 1).

50 La mayoría de los pacientes con cáncer, cuya enfermedad progresa a enfermedad metastásica desarrollan caquexia durante su programa de tratamiento y la caquexia contribuye a sus muertes. La frecuencia de la pérdida de peso en los pacientes de cáncer oscila entre el 40 % para los pacientes con cáncer de mama, leucemia mielocítica aguda y sarcoma a más del 80 % en los pacientes con carcinoma de páncreas y de estómago. Aproximadamente el 60 % de los pacientes con carcinomas de pulmón, colon o próstata han experimentado pérdida de peso antes de comenzar la quimioterapia. A pesar de haberse establecido la relación entre la malnutrición pretratamiento (pérdida de peso) y el resultado adverso, no se ha demostrado una relación consistente ha sido demostrada entre el desarrollo de la caquexia y el tamaño del tumor, el estadio de la enfermedad y el tipo o la duración de la neoplasia maligna.

60 La caquexia por cáncer no es simplemente un efecto local del tumor. Las alteraciones en el metabolismo de las proteínas, las grasas y los hidratos de carbono se producen de forma habitual. Por ejemplo, las anomalías en el metabolismo de los hidratos de carbono incluyen tasas de recambio de glucosa total, aumento de la gluconeogénesis hepática, intolerancia a la glucosa y niveles elevados de glucosa. Con frecuencia se observan aumento de la lipólisis, aumento de ácidos grasos libres y recambio de glicerol, hiperlipidemia, y actividad reducida de la lipoproteína lipasa. La pérdida de peso asociada con la caquexia por cáncer está causada no solo por la reducción de los depósitos de grasa corporal sino también por una reducción de la masa de proteína total del cuerpo, con una amplia pérdida de masa muscular esquelética. El aumento del recambio de proteínas y la oxidación

de aminoácidos mal regulada también pueden ser importantes. Se ha implicado a la presencia de factores derivados del huésped producidos en respuesta al cáncer como agentes causantes de caquexia, por ejemplo, factor de necrosis tumoral α (TNF) o caquectina, interleucina-1 (IL-1), IL-6, interferón gamma (IFN) y prostaglandinas (PG) (por ejemplo, PGE₂).

5 La pérdida de peso es habitual en pacientes con carcinomas de pulmón y del tracto gastrointestinal, lo que da lugar a una pérdida masiva tanto de grasa corporal y de la proteína del músculo, mientras que las proteínas no musculares no se ven afectadas. Aunque la pérdida de grasa corporal es importante en términos de reservas de energía, es la pérdida de la proteína del músculo esquelético lo que da lugar a la inmovilidad y, en última instancia, al deterioro de la función de los músculos respiratorios, lo que lleva a la muerte por neumonía hipostática. Aunque la caquexia se acompaña con frecuencia de anorexia, la suplementación nutricional por sí sola no es capaz de mantener el peso corporal estable y cualquier peso que se gana se debe a un aumento en el tejido adiposo y el agua en lugar de de la masa corporal magra. Lo mismo es cierto para los estimulantes del apetito, tales como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, lo que sugiere que la pérdida de masa corporal magra es debida a factores distintos de la insuficiencia de energía.

20 La masa del músculo esquelético es un equilibrio entre la velocidad de la síntesis de proteínas y la velocidad de la degradación. Los pacientes con caquexia por cáncer muestran una depresión de la síntesis de proteínas en el músculo esquelético y un aumento de la degradación de proteínas, lo que se refleja en un aumento de la expresión de la ruta proteolítica ubiquitina-proteasoma, el determinante principal de la degradación de proteínas. Por lo tanto, el músculo esquelético de los pacientes con cáncer con caquexia muestra un aumento de la expresión del ARNm tanto de la ubiquitina como de las subunidades del proteasoma, mientras que la actividad proteolítica del proteasoma aumentó en paralelo con la expresión de ubiquitina. La incapacidad de los estímulos anabólicos para aumentar la masa corporal magra en pacientes caquéticos sugiere que la degradación de proteínas debe atenuarse antes de que la masa muscular pueda aumentar. El ácido eicosapentaenoico (EPA) regula por disminución la expresión aumentada de la ruta proteolítica de la ubiquitina-proteasoma en el músculo esquelético de ratones caquéticos y se ha demostrado que estabiliza el peso corporal en pacientes caquéticos con cáncer de páncreas. Cuando los pacientes consumieron un suplemento de alta densidad de energía que contiene 32 g de proteína y 2 g de EPA, el peso corporal aumentó y se atribuyó exclusivamente a un aumento en la masa corporal magra (Barber, M.D., Ross, J.A., Voss, A.C., Tisdale, M.J., Fearon, K.C.H. The effect of an oral nutritional supplement enriched with fish oil on weight-loss in patients with pancreatic cancer. *Br. J. Cancer*, 81: 80–86, 1999).

35 En un estudio reciente de May et al (May, P.E., Barber, A., D'Olimpio, J.T., Hourlhane, A. y Abumrad, N.N. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of β -hydroxy- β -methylbutyrate, arginine and glutamine. *Am. J. Surg.*, 183: 471–479, 2002) se demostró que una mezcla de HMB, arginina y glutamina era eficaz en el aumento de peso corporal en los pacientes con pérdida de peso con cáncer avanzado (estadio IV). Por otra parte, el aumento del peso corporal se atribuyó a un aumento de la masa sin grasa, como se observa con EPA.

40 El uso del ácido eicosapentaenoico ácido graso poliinsaturado se ha sugerido para el tratamiento de la caquexia mediante la inhibición de la actividad lipolítica de los agentes lipolíticos en los fluidos corporales y la actividad de la enzima guanidino-benzoatasa. Véase Tisdale, M.J. y Beck, A., patente de Estados Unidos n.º 5.457,130, presentada el 10 de octubre de 1995; y Tisdale, et al. *Cancer Research* 50: 5022–5026 (agosto de 1990). Sin embargo, el producto enseñado por Tisdale estaba en una forma de dosificación sólida, que requiere que un paciente ya enfermo trague de 12-16 cápsulas al día. Este método tenía serios inconvenientes, incluyendo la dificultad para tragar, producción de gases y mal olor.

50 Se ha descubierto que el HMB se es útil en el contexto de diversas aplicaciones. Específicamente, en la patente de Estados Unidos. Nº 6.031.000 de Nissen et al. describe una composición que comprende de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 30 g de HMB, donde de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 30 g se basa en el peso de la sal de calcio de HMB y de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 50 g de L-arginina libre y de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 50 g de L-glutamina libre. Esta patente también proporciona un método para el tratamiento de la pérdida de masa muscular asociada a la enfermedad de un animal, un método para disminuir el nivel de triglicéridos en suero de un animal, un método para disminuir la carga viral en suero de un animal y un método para la redistribución de la grasa en un animal que tiene una región visceral y una región subcutánea. Todos los métodos comprenden la administración al animal de una composición que comprende HMB y al menos un aminoácido libre.

60 La patente de EE.UU.. Nº 5.348.979 de Nissen et al. describe el uso de HMB en la retención de nitrógeno en sujetos humanos. La cantidad de HMB administrada es eficaz para conservar la proteína tal como se determina mediante la reducción de nitrógeno urinario. El método puede utilizarse con pacientes que tienen un equilibrio negativo de nitrógeno debido a enfermedades y también con personas ancianas normales que están sujetos a pérdida de proteínas. El HMB se puede administrar por vía oral o por infusión intravenosa. Una cantidad eficaz de HMB está dentro del intervalo de 0,01 a 0,20 gramos de HMB sobre la base de su sal de calcio por kilogramo de peso corporal durante 24 horas.

65

La patente de Estados Unidos. N.º 5.028.440 de Nissen describe un método para aumentar la producción de carne de animales domésticos para incrementar el desarrollo de tejido magro. El HMB o una sal comestible del mismo se administran a los animales en una cantidad durante un periodo de tiempo suficiente para obtener un aumento sustancial del peso de tejido magro. El método está adaptado particularmente para su uso con rumiantes, incluyendo ganado vacuno y corderos, ya que el HMB no está sujeto a una destrucción apreciable del rumen. El método también puede ponerse en práctica con otros animales domésticos, incluyendo pollos y pavos. HMB se administra en el intervalo de 0,5 a 100 mg.

La patente de Estados Unidos n.º 4.992.470 de Nissen describe que el uso de HMB es notablemente más eficaz para la activación de la función inmune de los linfocitos T de mamíferos que el alfa-ketoisocaproato (CCI). Para la activación de la T linfocitos, se administra HMB o una sal del mismo soluble en agua y comestible al mamífero por una ruta a través de la que el HMB entra en la sangre del mamífero. La cantidad administrada es suficiente para la mejora eficaz de la blastogénesis de sus linfocitos T. El método está adaptado para su uso con mamíferos domésticos, incluyendo, en particular, ganado vacuno, ovejas y cerdos. El HMB también se puede utilizar con los seres humanos como estimulante del sistema inmunológico. El HMB (base de Ca-HMB) se administra por vía oral o parenteral en una cantidad de 500 a 2.500 miligramos (mg) por sujeto humano durante 24 horas.

La patente alemana DE 29707308 de Kunz describe el uso de aminoácidos de cadena ramificada en combinación con HMB para estimular la generación muscular en la población de entrenamiento con pesas. Kunz enseña que un suplemento de 3 g al día con un consumo de proteínas de 200 g al día aumenta el valor de la proteína nutricional y aumenta significativamente la eficiencia de la proteína. Kunz también enseña que los mejores efectos se pueden lograr cuando el HMB se combina con hidrolizados de proteínas y/o mezclas de aminoácidos libres en lugar de con proteínas intactas (puras).

La patente de Estados Unidos 5.976.50 de Engel et al. describe un suplemento de alimento dietético para la reducción de peso formado por una mezcla de un producto de confitería a base de azúcar que contiene cantidades terapéuticas de quitosano, kava y un nutracéutico quemador de grasas que pueden incluir colina/inusital, picolinato de cromo, HMB, carnitina y piruvato. El ingrediente nutracéutico mezclado con quitosano y kava funciona quemando cualquier grasa que el cuerpo ha consumido, es decir, metaboliza mejor cualquier grasa que se ingiere y no atraída al quitosano.

Los productos comerciales diseñados para la población de levantamiento de pesas que contienen HMB incluyen Lean DynamX de EAS Inc. de Golden, Colorado. Lean DynamX ofrece una mezcla de ingredientes que estimula la pérdida de grasa sin el uso de estimulantes fuertes. Los ingredientes incluyen HMB, picolinato de cromo, ácido linoleico conjugado, hojas y tallos de mate y tartrato de carnitina. La composición en polvo se mezcla con agua y se toman 2-3 porciones al día, con una ración tomada 30 minutos antes de los entrenamientos.

Productos comerciales adicionales incluyen Mega HMB Fuel[®] de Twiniab Corporation en Hauppauge, NY. Mega HMB Fuel[®] contiene 750 mg de HMB en una cápsula. La dosis diaria sugerida es de 4 cápsulas para soportar el daño a las células musculares que se puede producir después de un ejercicio de resistencia intenso

También es de interés la patente de Estados Unidos n.º 5.444.054 de Garleb, et al. y la patente de Estados Unidos relacionada 5.780.451. Estos documentos describen composiciones y métodos útiles en el tratamiento de la colitis ulcerosa. Tales composiciones incluyen una fuente de proteínas que pueden ser proteínas intactas o hidrolizadas de alto valor biológico (col. 21); un oligosacárido indigerible, tal como fructooligosacárido; y una mezcla de lípidos que contiene una proporción relativamente alta de ácido eicosapentaenoico, que contribuye a una proporción de ácidos grasos ω -3 y ω -6 relativamente alta. Las rutas biológicas de ácidos grasos de cadena larga y acciones fisiológicas se tratan en la patente de Estados Unidos 5.223.285 de DeMichele, et al.

La prevención y/o el tratamiento de la caquexia siguen siendo un problema frustrante. Estudios en animales y seres humanos sugieren que el soporte nutricional es, en gran medida, ineficaz en lo que respecta a la repleción de la masa corporal magra en el huésped con cáncer. Los ensayos aleatorizados que exploran la utilidad del soporte de nutrición parenteral total (NPT) como complemento a la terapia citotóxica antineoplásica han demostrado poca mejora en los resultados del tratamiento. Véase, por ejemplo Brennan, M.F. y Burt, M.E., 1981, Cancer Treatment Reports 65 (Suppl. 5): 67-68. Esto, junto con una clara demostración de que la NPT puede estimular el crecimiento tumoral en animales sugiere que el uso rutinario de la NPT en el tratamiento del cáncer no está justificado. Kisner, D.L., 1981, Cancer Treatment Reports 65 (Suppl. 5): 1-2.

El documento WO94/06417 describe el uso de HMB para reducir los niveles en sangre de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de colesterol total.

Maat, et al., Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2003, Vol. 1, p. 950-957, describen un estudio que evalúa la asociación entre las variables inflamatorias y de trombosis y la gravedad de la aterosclerosis en un grupo basado en la población de varones y mujeres de 60 años de edad. En este documento se llegó a la conclusión de que en este estudio, la trombosis y la inflamación se asocian con la gravedad de la aterosclerosis, como lo refleja el grosor de las capas íntima-media y la aparición de placas.

Clark, et al., Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 2000, Vol. 24(3), p. 133–139 describen un estudio de de evaluación de si una combinación de HMB, L-glutamina y L-arginina podría alterar de forma sinérgica el curso de la pérdida de masa muscular en pacientes con SIDA establecido. Clark, et al. concluyeron que la mezcla de HMB/L-arginina/L-glutamina puede alterar notablemente el curso de la pérdida de tejido magro en pacientes con pérdida de masa muscular asociada al SIDA.

El documento WO99/66917 se refiere a composiciones que comprenden HMB y al menos un aminoácido y al uso de las composiciones para el tratamiento de la pérdida de masa muscular asociada a la enfermedad de un animal, para disminuir el nivel de triglicéridos en suero de un animal, para disminuir la carga viral en suero de un animal, para redistribuir la grasa en un animal que tiene una región visceral y una región subcutánea, para aumentar la masa de tejido magro de un animal sin disminuir sustancialmente la masa grasa del animal y para aumentar el nivel de colesterol HDL de un animal.

El documento WO98/04253 se refiere al uso de piruvato en combinación con un bloqueante de cortisol para aumentar la masa corporal magra o el tejido muscular, disminuir la deposición de grasa y aumentar la resistencia y el rendimiento deportivo de un mamífero. El bloqueador de cortisol puede ser fosfatidilserina, HMB, DHEA, CLA, esteroides anabólicos, monohidrato de creatina, pregnenalona o ipriflavona.

El documento WO94/14429 se refiere a métodos para estimular la retención de nitrógeno en sujetos humanos mediante la administración de HMB a los sujetos.

La presente invención proporciona una composición que comprende ácido beta-hidroxi-beta-metilbutírico (HMB) o sus sales para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria crónica o una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, virus de la inmunodeficiencia humana/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH/SIDA), artritis, traumatismo, enfermedad hepática, enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias intestinales (EII), insuficiencia renal y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en un paciente mediante la regulación por disminución de la expresión y/o la actividad de los componentes seleccionados del grupo que consiste en proteína cinasa C, factor nuclear kappa-B, enzimas de conjugación con ubiquitina y componentes del proteasoma 26S.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 presenta un esquema que describe los potenciales acontecimientos intracelulares en el músculo esquelético involucrado en la activación del proteasoma inducida por PIF.

La figura 2 presenta las curvas de dosis-respuesta para el efecto del HMB sobre el peso corporal (A) y el volumen del tumor (B) en ratones portadores del tumor MAC16. El HMB (en PBS) se administró por vía oral mediante alimentación por sonda en un régimen diario a una concentración de 0,05 (●), 0,125 (○) y 0,25g/kg (X). Los ratones control recibieron PBS solo (□). Los resultados mostrados son la media ± SEM, n = 20.

La Figura 3 presenta el efecto de HMB (0,25g/kg; ■), EPA (0,6 g/kg; X) y la combinación (○), junto con los controles de PBS (●) sobre el peso corporal de los ratones portadores del tumor MAC16. Los resultados mostrados son la media ± SEM, n = 20.

La Figura 4 presenta el peso de los músculos sóleo (A) y la velocidad de degradación de proteínas en el músculo sóleo (B) de los ratones portadores del tumor MAC16 y tratados con EPA (0,6g/kg), HMB (0,25 g/kg) o la combinación durante 3 días. Los valores mostrados son la media ± SEM, n = 6.

La Figura 5 presenta el efecto de HMB y EPA sobre la actividad funcional del proteasoma, determinada como la actividad de la enzima "de tipo quimotripsina" en el músculo gastrocnemio de ratones portadores del tumor MAC16 y tratados durante 3 días. Los resultados se muestran como la media ± SEM, n = 6.

La Figura 6 presenta la expresión de las subunidades α del proteasoma 20S (A) y las subunidades β , (B), detectada mediante transferencia de tipo Western, en el músculo gastrocnemio de ratones tratados durante 3 días con PBS (control), HMB (0,25 g/kg), EPA (0,6 g/kg) o la combinación. Se muestra el análisis densitométrico de las manchas (n = 6). A. de control (barras cerradas), HMB (barras blancas), EPA (barras moteadas) y la combinación (barras punteadas).

La Figura 7 presenta la expresión de las subunidades α del proteasoma 19S (A), MSS1 (A) y p42 (B), detectada mediante transferencia de tipo Western, en el músculo gastrocnemio de ratones tratados durante 3 días con PBS (control), HMB (0,25 g/kg), EPA (0,6 g/kg) o la combinación (HMB+EPA). Se muestra el análisis densitométrico de las manchas (n = 6).

La Figura 8 presenta la expresión de E2_{14k}, detectada mediante transferencia de tipo Western, en el músculo gastrocnemio de ratones tratados durante 3 días con PBS (control), HMB (0,25 g/kg), EPA (0,6 g/kg) o la combinación (HMB+EPA). Se muestra el análisis densitométrico de las manchas (n = 6).

Figura 9 (A) presenta el efecto de PIF sobre la degradación de proteínas totales en miotubos C₂C₁₂ en ausencia (X) o presencia de EPA 50 μM (□) o HMB (●) 25 μM (○) o 50 μM (●). Las mediciones se realizaron 24 horas después de la adición de PIF y se muestran como media ± SEM, donde n = 9. 1 (B) presenta la actividad quimotróptica de extractos solubles de miotubos murinos tratados con PIF en ausencia o presencia de EPA (50 μM) o HMB (25 o 50 μM). Los símbolos son los mismos que en (A). Los resultados se muestran como la media ± SEM, n = 9.

La Figura 10 presenta el efecto de EPA y HMB en la inducción con PIF de la subunidad α del proteasoma 20S (A), la subunidad β (B) y p42 (C). El control de carga de actina se muestra en (D). Las transferencias de tipo Western de extractos solubles de miotubos C₂C₁₂ 24 horas después del tratamiento con PIF sola (calles A-C) o con PIF en presencia de 50 mM de EPA 50 μM (calles D-F), HMB 50 μM (calles G-I) o HMB 25 μM (calles J-L) a una concentración de PIF de 4,2 nM (calles B, e, H y K) o 10 nM (calles C, F, I y L). Los cultivos control recibieron PBS (calle A), EPA 50 μM (calle D), HMB 50 μM (calle G) o HMB 50 μM (calle J). Las manchas mostradas son representativas de tres experimentos separados.

La figura 11 presenta la transferencia de tipo Western del efecto de PIF sobre la PKC_α citoplasmática (A) y unida a la membrana (B) en miotubos murinos. Las células se trataron con PIF solo (calles A-C) o con PIF en presencia de EPA 50 μM (calles D-F), HMB 50 μM (calles G-I) o HMB 25 μM (calles J-L) a 4, 2 nm (calles B, e, H y K) o 10 nM de PIF (calles C, F, I y L). Las células control recibieron PBS (calle A), EPA 50 μM (calle D), HMB 50 μM (calle G) o HMB 50 μM (calle J). Las manchas mostradas son representativas de tres experimentos separados.

La Figura 12 presenta transferencias de tipo Western de ERK 1/2 total (p44 y p42) (A) y ERK 1/2 activa (fosforilada) (B) en extractos solubles de miotubos murinos tratados con PIF solo (calles A-C) o con PIF en presencia de EPA 50 μM (calles D-F), HMB 50 μM (calles G-I) o HMB 25 μM (calles J-L) a una concentración de PIF de 4,2 nM (calles B, E, H y K) o 10 nM (calles C, F, I y L). Las células control recibieron PBS (calle A), EPA 50 μM (calle D), HMB 50 μM (calle G) o HMB 50 μM (calle J). Las manchas mostradas son representativas de tres experimentos separados.

Figura 13 presenta el efecto de la exposición de los miotubos C₂C₁₂ durante 30 minutos a niveles citosólicos de IκBα (A), determinado mediante transferencia de tipo Western y activación de la unión de NF-κB al ADN, determinado mediante EMSA (B y C). El análisis densitométrico es un promedio de 3 manchas replicadas o EMSA. A) Los miotubos se trataron con PIF solo (calles A-E) o con PIF en presencia de HMB 50 μM a una concentración de PIF de 0 (calles A y F), 2,1 (calles B y G), 4,2 (calles C y H), 10,5 (calles D e I) o 16,8 nM (calles E y J). En (B) y (C), los miotubos se trataron con PIF 0, 2,1, 4,2, 10,5 y 16,8 nM en ausencia (barras oscuras) o presencia (barras abiertas) de HMB 25 μM (B) o HMB 25 μM (C).

Descripción detallada de la invención

El término HMB, que también se conoce como ácido beta-hidroxi-beta-metilbutírico o ácido beta-hidroxi-isovalérico, puede representarse en su forma de ácido libre como (CH₃)₂(OH)CCH₂ COOH. El HMB es un metabolito de la leucina formado por transaminación a alfa-cetoisocaproato (KIC) en el músculo seguido de oxidación de KIC en el citosol del hígado para dar HMB.

El término "aminoácidos neutros grandes" se refiere a leucina, isoleucina, valina, tirosina, treonina y fenilalanina. Los aminoácidos son los bloques componentes de proteínas. Se caracterizan por la presencia de un grupo carboxilo (COOH) y un grupo amino (NH₂) unidos al mismo carbono al final del compuesto.

El término "que carece sustancialmente de aminoácidos libres" se refiere a composiciones que contienen menos de 0,4 gramos de contenido de amino ácido libre total en una dosis diaria de la composición. Por ejemplo, si el producto está diseñado para su alimentación a una velocidad de 1 lata por día, la lata de producto contiene menos de un total de 0,4 gramos de aminoácidos libres. Los aminoácidos en cuestión son los L-isómeros de origen natural, que consisten en uno o más de los siguientes compuestos: L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-cisteína (o L-cistina), L-ácido glutámico, L-glutamina, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina y L-valina, o sus sales, ésteres, sales o derivados alimentaria o farmacéuticamente aceptables (tales como ésteres de metilo o etilo).

El término "caquexia" se refiere a un estado de mala salud y malnutrición general. A menudo está asociada e inducida por una cáncer maligno y se caracteriza por pérdida de apetito, pérdida de masa corporal, especialmente masa corporal magra, y pérdida de masa muscular.

El término "ácidos grasos" se refiere a una familia de ácidos carboxílicos que tienen una cadena de hidrocarburo, generalmente de aproximadamente 12 a 24 carbonos de longitud. Cuando está insaturado (que tiene un doble enlace) al menos un punto de la cadena hidrocarburo, tales ácidos grasos están designados por la posición del primer doble enlace. Los ácidos grasos ω-3 tienen un primer doble enlace en el tercer carbono desde el extremo metilo de la cadena; e incluyen, pero no se limitan a, ácido α-linolénico, ácido estearidónico, ácido eicosapentaenoico ("EPA"), ácido docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico ("DHA") y similares. Los ácidos

grasos ω -6 como tener un primer doble enlace en el sexto carbono desde el extremo metilo de la cadena; e incluyen, pero no se limitan a, ácido linoleico, ácido γ -linolénico, ácido araquidónico ("AA"), y similares.

5 El término "productos alimenticios", como se utiliza en el presente documento, se refiere a vehículos de administración que contienen una o más de grasas, nitrógeno amino e hidratos de carbono, y proporciona parte o la totalidad del soporte nutricional para un paciente en las cantidades diarias recomendadas. Con frecuencia, un producto alimenticio contendrá vitaminas, minerales, oligoelementos y similares, para proporcionar una nutrición equilibrada para sustitutos de comidas, alimentos médicos, suplementos. Los productos alimenticios pueden estar en cualquier forma típica, tales como bebidas, polvos, barras, zumos, bebidas carbonatadas, agua embotellada.

10 El término "ingestas diarias de referencia o IDR" se refiere a un conjunto de referencias dietéticas basadas en las cantidades diarias recomendadas para las vitaminas y minerales esenciales. Las cantidades diarias recomendadas son un conjunto de raciones de nutrientes estimadas establecidas por la Academia Nacional de Ciencias, que se actualizan periódicamente para reflejar el conocimiento científico actual.

15 El término "paciente" se refiere a seres humanos, perros, gatos y cualquier otro animal no rumiante.

20 Cualquier referencia a un intervalo numérico en esta solicitud debe considerarse que está modificado por el adjetivo "aproximadamente". Además, cualquier intervalo numérico se debe considerar que proporciona apoyo a una reclamación dirigida a un subgrupo de dicho intervalo. Por ejemplo, una divulgación un intervalo de 1 a 10 debe considerarse que proporciona apoyo en la especificación y reivindicaciones a cualquier subgrupo en dicho intervalo (esto es, intervalos de 2-9, 3-6, 4-5, 2,2-3,6, 2,1-9,9, etc.).

25 Aunque no se pretende que la invención esté limitada a ninguna teoría particular de funcionamiento, los solicitantes describen más adelante un mecanismo probable.

30 En tiempos de necesidad extrema (por ejemplo, inanición y similares), el cuerpo a menudo usa el músculo esquelético como un reservorio de aminoácidos y energía. Esto está mediado por la regulación por aumento la proteólisis y la regulación por disminución de la síntesis de proteínas en el músculo. El resultado neto de lo cual es la liberación de aminoácidos del músculo a la circulación general para su uso en el mantenimiento de sistemas críticos. Cuando la buena salud y la disponibilidad adecuada de nutrientes se restauran, el músculo se reconstruye. En el caso de la caquexia, este sistema se activa de manera inapropiada, por lo que incluso en el caso de la adecuación nutricional, las proteínas del tejido muscular continúan degradándose.

35 Uno de los sistemas proteolíticos clave que se activan inapropiadamente es el sistema de la ubiquitina proteosoma. Cuando funciona normalmente, este sistema reconoce las proteínas que han envejecido o de alguna otra manera están dañadas o ya no son necesarias, y las marca para su eliminación a través de la conjugación con ubiquitina. Tales proteínas ubiquitiniladas son reconocidas por el proteosoma y degradadas, de modo que se libera ubiquitina y péptidos libres y aminoácidos libres en un proceso que consume energía. Hay una serie de moléculas señalizadoras que activan o regulan por aumento este sistema, incluyendo el factor inductor de la proteólisis (PIF), que es un factor proteico producido por ciertos tumores inductores de caquexia. La unión de PIF de la célula muscular produce la regulación por aumento de la fosfolipasa A (PLA). Esto a su vez produce factores de señalización que, finalmente, activan la proteína cinasa C, lo que da lugar a la activación de genes (a través del factor nuclear kappa B, NFkB) para la conjugación de ubiquitina y para ciertas subunidades del proteosoma. El resultado neto de toda esta señalización es la es la regulación por aumento del sistema ubiquitina proteosoma y la degradación de proteínas sostenida e inadecuada en el músculo. La figura 1 muestra una ruta detallada de esta secuencia de activación.

Proteína cinasa C

50 La proteína cinasa C es una familia de serina-treonina cinasas activadas por calcio y lípidos que desempeñan papel clave en numerosas cascadas de señalización intracelulares. Hay por lo menos 12 isotipos de PKC diferentes, que se agrupan en tres clases basándose en su estructura primaria y propiedades bioquímicas (CA Carter: "Protein kinase C as a drug target: Implications for drug or diet prevention and treatment of cancer." Current Drug Targets 1:163-183 (2000). Estos son las convencionales - (cPKC α , β I, β II y γ) que requieren de diacilglicerol, fosfatidilserina y calcio para la su activación, nuevas (nPKC δ , ϵ , η θ y μ) que requieren diacilglicerol y fosfatidilserina, pero son independientes de calcio, y las atípicas (aPKC λ , τ y ξ) que son independientes de calcio y de diacilglicerol.

60 PKC se sintetiza como una proenzima unida a la membrana. La eliminación de la proenzima mediante escisión proteolítica y la posterior fosforilación libera una enzima competente de la membrana al citosol. La posterior interacción con los conjuntos particulares de activadores produce enzima activa. Por lo tanto, hay varios niveles de regulación posibles, incluyendo el control de la expresión, el control del procesamiento proteolítico, el control de acontecimientos de fosforilación iniciales y, por último, la regulación de los niveles citosólicos de los diversos activadores necesarios para la actividad completa.

65 La proteína cinasa C está implicada en algunas de las rutas de señalización que conducen a la mitogénesis y la proliferación de las células, la apoptosis, la activación de plaquetas, la remodelación del citoesqueleto de actina, la

modulación de los canales iónicos y la secreción. Además, otra observación de que la PKC es también el principal receptor para los ésteres de forbol estimulantes tumorales proporcionaba un reactivo clave para estudiar el mecanismo de acción de esta enzima. La PKC regula las rutas relevantes a estados patológicos de inflamación, cardiovasculares, microvasculares periféricos, del SNC, oncológicos e infecciosos, y se consideran objetivos serios e importantes para el desarrollo de fármacos (P. G. Goekjian y M. R. JIrousek: "Protein Kinase C in the Treatment of Disease: Signal Transduction Pathways, Inhibitors, and Agents in Development" *Current Medicinal Chemistry* 6(9): 877 – 903, (1999); CA O'Brian, NE Ward, KR Gravit y KP Gupta: "The tumor promoter receptor protein kinase C: A novel target for chemoprevention and therapy of human colon cancer." *Growth Factors and Tumor Promotion: Implications for Risk Assessment*, páginas 117 – 120 © 1995, Wiley–Liss, Inc.; F Battaini: "Protein kinase C isoforms as therapeutic targets in nervous system disease states." *Pharmacological Research* 44(5):353–361, (2001); RN Frank: "Potential new medical therapies for diabetic retinopathy: protein kinase C inhibitors. *Am J Ophthalmol* 133:693–698 (2002); M Meier y GL King: "Protein kinase C activation and Its pharmacological inhibition In vascular disease." *Vascular Medicine* 5:173–185 (2000)).

15 **NFκB**

El factor nuclear κ B (NFκB) es una familia de factores de transcripción que se encuentran en una amplia variedad de células de mamífero. La molécula madura es un homodímero o heterodímero, formado por uno o dos de los siguientes 5 productos génicos ((RelA (p65), p50, RelB, c–Rel y p62), el más frecuente es un dímero de RelA y p50. En condiciones no activadas, el NFκB se localiza en el citosol por asociación con una proteína inhibidora IκBα. La señalización aguas arriba implica una cinasa IκB y la fosforilación de IκBα unida da lugar a su liberación de NFκB,, lo que permite a este último trasladarse al núcleo y activar la transcripción de genes específicos. La IκBα fosforilada es degradada por la ruta de ubiquitina – proteosoma.

El NFκB es ampliamente reconocido como una molécula reguladora clave asociada con la inflamación. Por lo tanto, desempeña un papel clave en las enfermedades inflamatorias tanto agudas como crónicas (AB Lentsch y PA Ward: "Activation and regulation of NFκB during acute inflammation." *Clin Chem Lab Med* 37(3):205–208 (1999)). También desempeña un papel en ciertos aspectos de otras enfermedades, tal como la metástasis del cáncer (VB Andela, AH Gordon, G Zotalis, RN Rosier, JJ Goater, GD Lewis, EM Schwarz, JE Puzas y RJ O'Keefe: "NFκB: A pivotal transcription factor in prostate cancer metastasis to bone." *Clinical Orthopaedics and Related Research* 415S:S75–S85 (2003)). Este factor de transcripción está implicado en el desarrollo del síndrome diabético (E. Ho y TM Bray: "Antioxidants, NFκB activation and diabetogenesis." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 222:205–213 (1999)) y en el desarrollo inmunológico y la regulación (J Moscat, MT Diaz–Meco y P Rennert: "NFκB activation by proptein kinase C isoforms and B–cell function." *EMBO Reports* 4:31–36 (2003)). Finalmente, el NFκB se asocia con el control de la apoptosis y en el crecimiento y la diferenciación. De hecho, se cree que el PIF (factor inductor de la proteólisis, que liberan los tumores y está implicado en las pérdidas de masa magra inducidas por cáncer) es un regulador del desarrollo embrionario y desencadena una cascada de señalización en última instancia, a través del NFκB (F. Delfino y WH Walker: "Hormonal regulation of the NFκB signaling pathway." *Molecular and Cellular Endocrinology* 157:1–9 (1999); TM Watchorn, I Waddell, N Dowidar y JA Ross: "Proteolysis–inducing factor regulates hepatic gene expression via the transcription factor NFκB and STST3." *FASEB J* 15:562–564 (2001)).

También es bien sabido que el EPA ejerce sus efectos beneficiosos sobre la caquexia mediante la inhibición de la señalización que resulta de la activación de PLA, en particular, la liberación de ácido araquidónico (AA). Esto evita la posterior regulación por incremento y activación de la ruta de la ubiquitina–proteosoma mediante la eliminación del acontecimiento de señalización inicial. El HMB, aunque no impide la activación de PLA o la liberación de AA, sí impide la regulación por aumento de la proteína cinasa C, de modo que se impide toda la activación posterior de la ruta de señalización, impidiendo también, en última instancia, la activación del sistema de ubiquitina–proteosoma.

Sorprendentemente e inesperadamente, ahora se ha descubierto que HMB por sí solo puede reducir la tasa de crecimiento tumoral y en combinación con niveles de dosis subóptimas de EPA potencia el efecto anticaquético. La combinación de EPA y HMB conserva la masa muscular mediante la atenuación de la degradación de proteínas a través de la regulación por disminución de la expresión aumentada de componentes reguladores clave de la ruta proteolítica de ubiquitina–proteosoma.

El término "HMB" se refiere al compuesto que tiene la fórmula química anterior, tanto en sus formas de ácido libre y sales, metabolitos y derivados del mismo. Aunque se puede usar cualquier forma adecuada de HMB en el contexto de la presente invención, preferentemente, el HMB se selecciona del grupo que consiste en un ácido libre, una sal, un éster, y una lactona; más preferentemente, HMB es una sal.

Aunque se puede usar cualquier sal de HMB farmacéuticamente adecuada en el contexto de la presente invención, preferentemente, la sal de HMB es soluble en agua o se convierte en soluble en agua en el estómago o los intestinos de un paciente. Más preferentemente, la sal de HMB se selecciona del grupo que consiste en una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de magnesio, una sal de cromo y una sal de calcio. Lo más preferentemente, la sal de HMB es una sal de calcio. Sin embargo, se pueden usar otras sales no tóxicas, tales como otras sales de metales alcalinos o alcalinotérreos.

Del mismo modo, se divulga cualquier éster farmacéuticamente aceptable en el contexto de la presente invención. Deseablemente, el éster de HMB se convierte rápidamente en HMB en su forma de ácido libre. Preferentemente, el éster de HMB es un éster de metilo o éster de etilo. El éster de metilo de HMB y el éster de etilo de HMB se convierten rápidamente a la forma de ácido libre de HMB.

5 Del mismo modo, se divulga cualquier lactona farmacéuticamente aceptable en el contexto de la presente invención. Deseablemente, la lactona de HMB se convierte rápidamente en HMB en su forma de ácido libre. Preferentemente, la lactona de HMB es una lactona de isovalarilo o una lactona similar. Tales lactonas se convierten rápidamente a la forma de ácido libre de HMB.

10 Los métodos para producir HMB y sus derivados son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el HMB puede sintetizarse mediante oxidación del alcohol de diacetona. Un procedimiento adecuado lo describen Coffman et al., J. Am. Chem. Soc. 80: 2882–2887 (1958). Como se describe en el mismo, el HMB se sintetiza mediante una oxidación de hipoclorito de sodio alcalino de alcohol de diacetona. El producto se recupera en forma de ácido libre, que se puede convertir a la sal deseada. Por ejemplo, el ácido 3-hidroxi-3-metilbutírico (HMBA) se puede sintetizar a partir de alcohol de diacetona (4-hidroxi-4-metilpentan-2-ona) a mediante oxidación usando hipoclorito frío acuoso (lejía). Después de acidificar la mezcla de reacción con HCl, el producto HMBA se recupera mediante extracción usando acetato de etilo y mediante separación y retención de la capa orgánica de la mezcla de extracción. El acetato de etilo se elimina mediante evaporación y el residuo se disuelve en etanol. Después de la adición de Ca(OH)₂ y el enfriamiento, el CaHMB cristalino se puede recuperar por filtración, los cristales se lavan con etanol y después se secan. Como alternativa, la sal de calcio de HMB está comercialmente disponible en TSI en Salt Lake City, Utah.

25 El soporte nutricional en el paciente con cáncer puede clasificarse como (I) de apoyo, donde se instaure soporte nutricional para prevenir el deterioro nutricional en el paciente nutrido adecuadamente o para rehabilitar al paciente deteriorado antes de la terapia definitiva; (II) adyuvante, donde el soporte nutricional desempeña un papel integral en el plan terapéutico; y (III) definitivo, donde se requiere soporte nutricional agresivo para la existencia del paciente. Las rutas para proporcionar soporte nutricional incluyen una dieta oral, alimentación por sonda o nutrición parenteral periférica o total. La realización preferida para los métodos y composiciones nutricionales de la invención es por vía oral.

30 Una alternativa a la alimentación oral es la alimentación por sonda a través de sonda nasogástrica, nasoduodenal, esofagostomía, gastrostomía o tubos de yeyunostomía.

35 Los efectos beneficiosos que el HMB tiene sobre la masa corporal magra de un paciente se puede lograr de diversas maneras. Si se desea, el HMB se puede administrar solo, sin un vehículo. El HMB puede simplemente disolverse en agua y consumirlo el paciente. Como alternativa, el HMB puede rociarse sobre los alimentos, disolverse en café, etc. La dosis diaria total para el paciente variará ampliamente, pero típicamente un paciente se beneficiará del consumo de al menos de 2 g/día de HMB. Como alternativa, de 20 a 40 mg/kg/día.

40 En una realización adicional, el HMB puede incorporarse en pastillas, cápsulas, comprimidos de disolución rápida, pastillas para chupar, etc. La dosis activa puede variar ampliamente, pero típicamente variará en el intervalo de 250 mg a 1 g/dosis, consumiendo el paciente de 2 a 8 dosis/día para alcanzar el objetivo de 2g/día mínimo. Los métodos para preparar tales formas farmacéuticas son bien conocidos en la técnica. Se dirige la atención del lector a la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences para una orientación sobre la forma de preparar tales formas farmacéuticas.

50 Aunque el HMB se puede administrar como una sola entidad, normalmente se incorporará en productos alimenticios y lo consumirá el paciente durante sus comidas o aperitivos. Si se desea, el paciente puede simplemente modificar la receta de los alimentos que normalmente consume mediante rociado sobre los alimentos, disolución en el café, etc.

En una realización adicional, el HMB se incorporará a bebidas, barras, galletas, etc., que se han diseñado específicamente para mejorar la palatabilidad del HMB y aumentar la selección de formas alternativas, mejorando de este modo la aceptación por el paciente/consumidor.

55 Típicamente, el HMB se incorporará en bebidas sustitutivas de comidas, tales como Ensure[®], Boost[®], Glucerna[®], Pediasure[®], Pedialyte[®], etc. El HMB también se puede incorporar en las barras sustitutivas de comidas, tales como PowerBars[®], barras Glucerna[®], barras Choice DM[®], barras Ensure[®] y barras Boost[®], etc. Como alternativa, el HMB se puede incorporar en zumos, bebidas carbonatadas, agua embotellada, etc. Además, el HMB se puede incorporar en productos nutritivos médicos tales como ProSure[®], Promote[®], Jevity[®] y Advera[®] diseñados para soportar estados de enfermedad específicos tales como cáncer, VIH/SIDA, artritis, EPOC, etc. Los métodos para producir cualquier de tales productos alimenticios son bien conocidos para los expertos en la técnica. La siguiente discusión está destinada a ilustrar tales productos alimenticios y su preparación.

65 La mayoría de los productos sustitutos de comidas (es decir, barras o líquidos) proporcionan calorías de la grasa, los carbohidratos y las proteínas. Estos productos contienen también típicamente vitaminas y minerales, ya que están

destinados a ser adecuados para su uso como la única fuente de nutrición. Si bien estos productos sustitutos de comidas pueden servir como única fuente de nutrición, típicamente no lo hacen. Las personas consumen estos productos para sustituir una o dos comidas al día o para proporcionar un aperitivo saludable. Los productos nutricionales de la presente invención se deben interpretar que incluyen cualquiera de estas realizaciones.

5 La cantidad de estos ingredientes nutricionales puede variar ampliamente dependiendo de la población de pacientes específica (es decir, cáncer, VIH/SIDA, artritis, consideraciones organolépticas, preferencias culturales, uso, etc.). Sin embargo, como pauta general no limitante, los productos sustitutos de las comidas de la presente invención contendrán las siguientes cantidades relativas de proteínas, grasas y carbohidratos (sobre la base del porcentaje relativo de calorías totales): un componente de proteínas, que proporciona del 5 al 80 % de la contenido calórico total, que proporciona un componente de hidratos de carbono que proporciona del 10 al 70 % del contenido calórico total y un componente de lípidos que proporciona del 5 al 50 % del contenido calórico total.

15 Los sustitutos de las comidas contendrán hidratos de carbono, lípidos y proteínas adecuados, como conocen los expertos en la técnica de elaborar fórmulas nutricionales. Los hidratos de carbono adecuados incluyen, pero no se limitan a, almidones hidrolizados, intactos, modificados naturalmente y/o químicamente procedentes de maíz, tapioca, arroz o patata en formas cerosas o no cerosas; y azúcares, tales como glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, jarabe de maíz rico en fructosa, sólidos de jarabe de maíz, fructooligosacáridos, y mezclas de los mismos.

20 Los lípidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite de coco, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de cártamo rico en ácido oleico, aceite TCM (triglicéridos de cadena media), aceite de girasol, aceite de girasol rico en ácido oleico, aceite de palma, oleína de palma, aceite de canola, aceite de semilla de algodón, aceite de pescado, aceite de almendra de palma, aceite de menhaden, aceite de soja, lecitina, fuentes de lípidos de ácido araquidónico y ácido docosahexanoico, y mezclas de los mismos. Las fuentes lipídicas de ácido araquidónico y ácido docosahexanoico incluyen, pero no se limitan a, aceite marino, aceite de yema de huevo, y aceite de hongos o de algas.

30 Numerosas fuentes comerciales para estas grasas están fácilmente disponibles y son conocidas por una persona que ponga en práctica la técnica. Por ejemplo, los aceites de soja y de canola están disponibles en Archer Daniels Midland de Decatur, Illinois. Los aceites de maíz, coco, palma y almendra de palma están disponibles en Premier Edible Oils Corporation of Portland, Oregón. El aceite de coco fraccionado está disponible en Henkel Corporation of LaGrange, Illinois. Los aceites de cártamo rico en ácido oleico y de girasol rico en ácido oleico están disponibles en SVO Specialty Products de Eastlake, Ohio. El aceite marino está disponible en Mochida international of Tokyo, Japón. El aceite de oliva está disponible en Anglia Oils of North Humberstone, Reino Unido. Los aceites de girasol y de semilla de algodón están disponibles en Cargill of Minneapolis, Minnesota. El aceite de cártamo está disponible en California Oils Corporation of Richmond, California.

40 Además de estos aceites de calidad alimentaria, en el producto alimenticio se pueden incorporar lípidos estructurados, si se desea. Los lípidos estructurados se conocen en la técnica. Una descripción concisa de lípidos estructurados puede encontrarse en INFORM, Vol. 8, n.º 10, página 1004; titulado Structured lipids allow fat tailoring (Octubre de 1997). Véase también la patente de Estados Unidos n.º 4.871.768. Los lípidos estructurados son, predominantemente, triacilgliceroles que contienen mezclas de ácidos grasos de cadena media y larga en el mismo núcleo de glicerol. Los lípidos estructurados y su uso en la fórmula enteral también se describen en las patentes de Estados Unidos n.º 6,194 0,379 y 6,1600,007.

45 Opcionalmente, los ácidos grasos ω -3 pueden comprender aproximadamente 30 % de la mezcla de aceites, preferentemente los ácidos grasos ω -3 consisten en gran parte en ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico. Los aceites dietéticos utilizados en la preparación de la composición nutricional contienen, generalmente, ácidos grasos ω -3 en forma de triglicéridos e incluyen, pero no se limitan a, aceite de canola, triglicéridos de cadena media, de pescado, de soja, de lecitina de soja, de maíz, de cártamo, de girasol, de girasol rico en oleico, de cártamo rico en oleico, de oliva, de borraja, de grosella negra, de onagra y de linaza. Opcionalmente, la relación en peso de los ácidos grasos ω -6 y los ácidos grasos ω -3 en la mezcla de lípidos de acuerdo con la invención es de aproximadamente 0,1 a 3,0. La liberación diaria de ácidos grasos ω -3 debería ser al menos 450 mg y puede variar dependiendo del peso corporal, el sexo, la edad y el estado médico del individuo.

50 Como se ha mencionado, se desean niveles superiores para el consumo humano adulto: por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a 50 g al día, más preferentemente de aproximadamente 2,5 a 5 g al día.

60 Una ventaja inesperada de la combinación de ácidos grasos ω -3 y HMB es la mejora en el sabor del sustituto de la comida. Las fuentes típicas de ácidos grasos ω -3 son los aceites de pescado y de algas. Cada fuente trae sabores desagradables al producto sustituto de comidas. Los inventores descubrieron que añadiendo HMB se pueden obtener los mismos o mejores resultados clínicos relacionados con la prevención de la pérdida de peso involuntaria, incluso cuando se utilizan niveles subóptimos o menores de ácidos grasos ω -3 en el producto. En consecuencia, los inventores han descubierto que existe una relación inversa entre los niveles de ácidos grasos ω -3 y HMB. Por ejemplo, si una dosis eficaz de ácidos grasos ω -3 es de 3 g en 2 latas de sustituto de la comida, se observarían los mismos resultados clínicos en el producto formulado para que contenga 2 g de ácidos grasos ω -3 y 1 g de HMB liberado 2 latas o en el producto formulado para que contenga 1 g de ácidos grasos ω -3 y 2 g de HMB liberados en

2 latas. El producto formulado para que contenga solamente 1 g de ácidos grasos ω -3 tendrá un sabor mucho mejor que el producto formulado con 2 o 3 g de ácidos grasos ω -3, al tiempo que alcanza la misma eficacia clínica. Además, puesto que los ácidos grasos ω -3 son inhibidores conocidos del AA, un mediador de la inflamación, un producto que contiene ácidos grasos ω -3 y HMB podría tener beneficios más amplios que los que contienen cualquiera de los ingredientes de forma individual.

Fuentes de proteínas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, leche, suero de leche y fracciones de suero de leche, soja, arroz, carne (por ejemplo, carne de vacuno), animal y vegetal (por ejemplo, guisante, patata), huevo (albúmina de huevo), gelatina y pescado. Las fuentes de proteínas intactas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, base de soja base de leche, proteína de caseína, proteína de suero de leche, proteína de arroz, colágeno carne de vacuno, proteína de guisante, proteína de patata, y mezclas de los mismos.

Opcionalmente, la fuente de proteína intacta está enriquecida en aminoácidos neutros grandes (AANG) que comprenden valina, isoleucina, leucina, treonina, tirosina y fenilalanina. Por lo general, aproximadamente el 40 % de las fuentes de proteína de caseína, suero de leche y de soja son aminoácidos neutros grandes. Por ejemplo, el caseinato contiene aproximadamente 38 % en peso/peso de AANG, el concentrado de proteína de suero de leche contiene aproximadamente 39 % en peso/peso de AANG y el aislado de proteína de soja contiene aproximadamente 34 % en peso/peso de AANG. Típicamente, el sustituto de la comida se formula con una fuente de proteínas que liberará aproximadamente de 1 a 25 g de AANG al día, preferentemente de aproximadamente 1 a 20 g de AANG al día, más preferentemente de aproximadamente 4 a 20 g de AANG al día. A modo de ejemplo, un sustituto de la comida consumido 3 veces al día que contiene una proteína que comprende 4,8 g de AANG liberará 14,4 g de AANG al día.

Los sustitutos de las comidas, preferentemente, contienen también vitaminas y minerales en una cantidad diseñada para suministrar o complementar los requisitos nutricionales diarios de la persona que recibe la fórmula. Los expertos en la técnica reconocen que las fórmulas nutricionales incluyen a menudo excesos de ciertas vitaminas y minerales para asegurar que cumplen el nivel objetivo durante la vida útil del producto. Estos mismos individuos también reconocen que ciertos microingredientes pueden tener beneficios potenciales para las personas, dependiendo de cualquiera que sea la dolencia o enfermedad subyacente que afecta al paciente. Por ejemplo, los pacientes con cáncer se benefician de antioxidantes tales como beta-caroteno, vitamina E, vitamina C y selenio. Los productos alimenticios incluyen, preferentemente, pero no se limitan a, las siguientes vitaminas y minerales: calcio, fósforo, sodio, cloruro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, selenio, yodo, cromo, molibdeno, nutrientes condicionalmente esenciales m-inositol, carnitina y taurina, y las vitaminas A, C, D, E, K y el complejo B, y mezclas de los mismos.

El nutriente condicionalmente esencial carnitina es un aminoácido de origen natural formado a partir de metionina y lisina. Su principal papel metabólico está asociado con el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de las membranas mitocondriales, de modo que estimulan la oxidación de estas sustancias combustibles para energía metabólica. El suplemento con carnitina es una herramienta metabólica importante en condiciones tales como enfermedades del hígado y el riñón, y las principales enfermedades crónicas o lesiones extensas complicadas por la malnutrición. Opcionalmente, los sustitutos de las comidas pueden complementarse con carnitina a niveles suficientes para proporcionar hasta 4 g/día de carnitina.

Los sustitutos de las comidas también pueden contener fibra y estabilizantes. Las fuentes adecuadas de fibra y/o estabilizantes incluyen, pero no se limitan a, goma de xantano, goma guar, goma arábica, goma ghatti, goma karaya, goma tragacanto, agar, furcellarano, goma gellan, goma de algarroba, pectina, pectina con niveles bajos y altos de metoxi, glucanos de avena y cebada, carragenanos, psyllium, gelatina, celulosa microcristalina, CMC (carboximetilcelulosa de sodio), hidroxipropilmetilcelulosa metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, DATEM (ésteres de ácido diacetiltartárico de monoglicéridos y diglicéridos), dextrano, carrageninas, FOS (fructooligosacáridos), y mezclas de los mismos. Existen numerosas fuentes comerciales de fibras dietéticas solubles disponibles. Por ejemplo, la goma arábica, carboximetilcelulosa hidrolizada, goma guar, pectina y las pectinas con niveles altos y bajos de metoxi están disponibles en TIC Gums, Inc. de Belcamp, Maryland. Los glucanos de avena y de cebada están disponibles en Mountain Lake Specialty Ingredients, Inc. de Omaha, Nebraska. El psyllium está disponible en la Meer Corporation of North Bergen, Nueva Jersey mientras que el carragenano está disponible en FMC Corporation of Philadelphia, Pensilvania.

La fibra incorporada también puede ser una fibra dietética insoluble, ejemplos representativos de la cual incluyen fibra de cáscara de avena, fibra de cáscara de guisante, fibra de cáscara de soja, fibra de cotiledón de soja, fibra de remolacha de azúcar, celulosa y salvado de maíz. También hay disponibles numerosas fuentes de las fibras dietéticas insolubles. Por ejemplo, el salvado de maíz está disponible en Quaker Oats de Chicago, Illinois; la fibra de cáscara de avena en Canadian Harvest de Cambridge, Minnesota; la fibra de cáscara de guisante en Woodstone Foods of Winnipeg, Canadá; la fibra de cáscara de soja y la fibra de cáscara de avena en The Fibrad Group of LaVale, Maryland; la fibra de cotiledón de soja en Protein Technologies International of St. Louis, Missouri; la fibra de remolacha azucarera en Delta Fiber Foods of Minneapolis, Minnesota y la celulosa en James River Corp, of Saddle Brook, Nueva Jersey.

Una discusión más detallada de ejemplos de fibras y su incorporación en los productos alimenticios puede encontrarse en la patente de Estados Unidos n.º 5.085.883 expedida a Garleb et al.

5 La cantidad de fibra utilizada en las fórmulas puede variar. El tipo particular de fibra que se utiliza no es crítico. Puede usarse cualquier fibra adecuada para el consumo humano y que sea estable en la matriz de un producto alimenticio.

10 Además de la fibra, los sustitutos de las comidas también pueden contener oligosacáridos, tales como fructooligosacáridos (FOS) o glucooligosacáridos (GOS). Los oligosacáridos fermentan rápida y extensamente en ácidos grasos de cadena corta por acción de los microorganismos anaerobios que habitan en el intestino grueso. Estos oligosacáridos son fuentes de energía preferentes para la mayoría de las especies de *Bifidobacterium*, pero no son utilizados por organismos potencialmente patógenos tales como *Clostridium perfringens*, *C. difficile* o *Escherichia coli*.

15 Típicamente, el FOS comprende de 0 a 5 g/ración del sustituto de la comida, preferentemente de 1 a 5 g/ración, más preferentemente de 2 a 4 g/ración de la sustitución de la comida.

20 Los sustitutos de las comidas también pueden contener un sabor para mejorar su palatabilidad. Se pueden añadir edulcorantes artificiales para complementar el sabor y enmascarar el sabor salado. Los edulcorantes artificiales útiles incluyen sacarina, NutraSweet, sucralosa, acesulfamo-K (acesulfamo potásico), etc.

25 Los sustitutos de comida pueden fabricarse utilizando técnicas bien conocidas para los expertos en la técnica. Existen diversas técnicas de procesamiento. Típicamente, estas técnicas incluyen la formación de una suspensión de una o más soluciones, que pueden contener agua y uno o más de los siguientes: carbohidratos, proteínas, lípidos, estabilizantes, vitaminas y minerales. El HMB se añade típicamente a la suspensión de hidratos de carbono antes que los otros minerales. La suspensión se emulsiona, se homogeneiza y se enfría. Se pueden añadir varias otras soluciones a la suspensión antes del procesamiento, después del procesamiento o en ambas ocasiones. A continuación se esteriliza la fórmula procesada y se puede diluir para secar hasta obtener un polvo, utilizado sobre
30 para un líquido listo para consumir o un líquido concentrado, se añadiría una cantidad apropiada de agua antes de la esterilización.

35 Las composiciones sólidas, tales como barras, galletas, etc., también pueden fabricarse usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden fabricarse mediante la tecnología de extrusión en frío como se conoce en la técnica. Para preparar tales composiciones, típicamente todos los componentes en polvo se pueden mezclar en seco juntos. Tales constituyentes incluyen típicamente las proteínas, premezclas de vitaminas, ciertos carbohidratos, etc. Los componentes solubles en grasa se combinan después y se mezclan con la premezcla en polvo anterior. Por último, los componentes líquidos se mezclan a continuación en la composición, formando una
40 composición o masa similar a un plástico.

45 El proceso anterior está destinado a dar una masa plástica que puede conformarse, sin más cambios físicos o químicos, mediante el procedimiento conocido como conformado o extrusión en frío. En este proceso, la masa plástica se fuerza a una presión relativamente baja a través de un molde, que confiere la forma deseada. Después, el exudado resultante se corta en una posición apropiada para dar productos del peso deseado. Si se desea, el producto sólido se reviste después para mejorar la palatabilidad y se envasa para su distribución. Típicamente, el envase proporcionará instrucciones para su uso por el consumidor final (es decir, para su consumo por un paciente con cáncer, para ayudar a prevenir la pérdida de masa muscular magra, etc.).

50 Las composiciones sólidas de la presente invención también pueden fabricarse a través de una aplicación de horneado o extrusión en caliente para producir cereales, galletas y galletas saladas. Un entendido en la materia podría seleccionar uno de los muchos procesos de fabricación disponibles para producir el producto final deseado.

55 Como se ha señalado anteriormente, el HMB también se puede incorporar en zumos, bebidas no carbonatadas, bebidas carbonatadas, soluciones de electrolitos, aguas saborizadas (en lo sucesivo colectivamente "bebida"), etc. El HMB comprenderá típicamente de 0,5 a 2 g/ración de las bebidas. Los métodos para producir tales bebidas son bien conocidos en la materia. Se dirige la atención del lector a la patente de Estados Unidos n.º 6.176.980 y 5.792.502. Por ejemplo, todos los ingredientes, incluyendo el HMB se disuelven en un volumen apropiado de agua. A continuación, opcionalmente se añaden sabores, colores, vitaminas, etc. A continuación, se pasteuriza la mezcla, se envasa y se almacena hasta su envío.

60 Cualquier enfermedad con la que se asocia la inflamación, tales como enfermedades cardiovasculares, microvasculares periféricas, del sistema nervioso central, oncológicas, del sistema inmunológico e infecciosas pueden tratarse de acuerdo con las presentes reivindicaciones. Preferentemente, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer, VIH/SIDA, artritis, traumatismo, enfermedad hepática, enfermedad de Crohn u otras
65 enfermedades inflamatorias intestinales (EII), insuficiencia renal y EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica).

En el presente documento se describe un método para el tratamiento de la pérdida de masa muscular asociada a la enfermedad de un paciente, tal como un mamífero, preferentemente un ser humano. El método comprende la administración al paciente de la composición descrita anteriormente, que comprende HMB en cantidades suficientes para tratar la pérdida de masa muscular asociada a la enfermedad, donde, tras la administración de la composición al paciente, se trata la pérdida de masa muscular asociada a la enfermedad.

La cantidad de HMB que es suficiente para tratar la pérdida de masa muscular asociada a la enfermedad en un paciente dado se pueden determinar de acuerdo con métodos bien conocidos en la materia. En el tratamiento de la pérdida de masa muscular asociada a la enfermedad de un paciente, de forma deseable, la composición que comprende HMB se administra a un paciente que sufre pérdida de masa muscular asociada a la enfermedad en una cantidad tal, de tal manera y durante un período de tiempo tal que la masa de tejido magro del paciente aumentará sin una disminución concomitante de la masa grasa del paciente. Un ejemplo, en el contexto del tratamiento de la pérdida de masa muscular asociada a la caquexia por cáncer de un ser humano, cuando la composición se administra por vía oral dos veces al día durante un mínimo de dos semanas; la dosis es suficiente para proporcionar al menos 2g de HMB al día.

En el presente documento se describe además un método para reducir la velocidad del crecimiento del tumor en un paciente, tal como un mamífero, preferentemente un ser humano. El método comprende la administración al paciente de la composición descrita anteriormente, que comprende HMB en cantidades suficientes para reducir la velocidad de crecimiento tumoral, donde, tras la administración de la composición al paciente, se reduce la velocidad de crecimiento tumoral.

La cantidad de HMB que es suficiente para atenuar el crecimiento del tumor en un paciente dado se puede determinar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Durante el tratamiento del crecimiento tumoral en un paciente, de forma deseable, la composición que comprende HMB se administra a un paciente que sufre de crecimiento del tumor en una cantidad tal, de tal manera, y durante un período de tiempo tan que la velocidad de de crecimiento del tumor del paciente disminuirá. Un ejemplo, en el contexto de tratar el crecimiento de tumores en un ser humano adulto, cuando la composición se administra por vía oral dos veces al día durante un mínimo de dos semanas; la dosis es suficiente para proporcionar al menos aproximadamente 2 g de HMB/día.

En el presente documento también se describe un método para la regulación por disminución de la expresión y/o actividad de la proteína quinasa C. Los ejemplos I - IV muestran que tanto EPA como HMB atenuaron la activación inducida por PIF de la proteína cinasa C (PKC) y la posterior degradación de I κ B α y la acumulación nuclear del factor nuclear κ B (NF- κ B).

En el presente documento también se describe un método para la regulación por disminución de la expresión y/o actividad de factor nuclear kappa-B. Los ejemplos I - IV muestran que tanto EPA como HMB atenuaron la activación inducida por PIF de la proteína cinasa C (PKC) y la posterior degradación de I κ B α y la acumulación del factor nuclear κ B (NF- κ B).

También de describe un método para la regulación por disminución de la expresión y/o actividad de las enzimas de conjugación a ubiquitina. Los ejemplos I-IV muestran que esto se acompañó de una reducción en la expresión de la enzima de conjugación con ubiquitina E2_{14k}. La combinación de EPA y HMB fue al menos tan eficaz o más eficaz que cualquiera de los tratamientos de forma individual. Estos resultados muestran que tanto EPA como HMB conservan la masa muscular mediante la atenuación de la degradación de proteínas a través de la regulación por disminución de la expresión aumentada de componentes reguladores clave de la ruta proteolítica de ubiquitina-proteasoma.

También de describe un método para la regulación por disminución de la expresión y/o actividad de las enzimas de los componentes 26S del proteasoma. Los ejemplos I-IV muestran que la actividad del proteasoma, determinado por la actividad de la enzima de tipo quimotripsina" se atenuó por el HMB. La expresión de proteínas de las subunidades α o β 20S se redujo en al menos un 50 %), al igual que las subunidades de la ATPasa MSS1 y p42 de la subunidad reguladora del 19S.

Ejemplo I (Ejemplo de referencia)

Prevención de la pérdida de peso y atenuación de la degradación de proteínas en animales con caquexia por cáncer

Este estudio evalúa el efecto de HMB, en comparación con EPA o su combinación, sobre la pérdida de peso inducida por el tumor MAC16 y los mecanismos implicados. La pérdida de peso inducida por el tumor MAC16 está inducida principalmente por PIF.

Los ratones NMRI macho de cepa pura (25 g de peso promedio) se obtuvieron de la propia colonia pura de los inventores y se les trasplantaron por vía subcutánea fragmentos del tumor MAC16 en el flanco por medio de un trocar, seleccionando de animales donantes con la pérdida de peso establecida como se describe en Bibby, M.C. et

al. Characterization of a transplantable adenocarcinoma of the mouse colon producing cachexia in recipient animals. *J. Natl. Cancer Inst.*, 78: 539–546, 1987. Los animales trasplantados fueron alimentados con una dieta para cría de ratas y ratones (Special Diet Services, Witham, Reino Unido) y agua a demanda, y la pérdida de peso fue evidente 10-12 días después de la implantación del tumor. Los animales justo antes del desarrollo de la pérdida de peso fueron aleatorizados para recibir a diario EPA (en aceite de oliva), HMB (en PBS) o la combinación como se describe en las leyendas de las figuras administrados por vía oral por sonda, mientras que los animales de control recibieron aceite de oliva o PBS. El EPA (98 % como ácido libre) se adquirió en Biomol Research Laboratories Inc., PA, EE.UU. El HMB (como la sal de calcio) se obtuvo en Abbott Laboratories, Columbus, Ohio, EE.UU. Todos los grupos contenían un mínimo de 6 ratones. El volumen del tumor, el peso corporal y la ingesta de alimentos y agua se controlaron diariamente. Se sacrificó a los animales por dislocación cervical cuando la pérdida de peso corporal alcanzó el 25 % y todos los estudios se llevaron a cabo de acuerdo con las Directrices UKCCR para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los músculos sóleo se diseccionaron rápidamente, junto con los tendones intactos, y se mantuvieron en solución salina isotónica enfriada con hielo antes de la determinación de la degradación de proteínas.

Los músculos sóleo recién resecados se fijaron a través de los tendones a soportes de alambre de aluminio, bajo tensión, a una longitud aproximadamente de reposo para evitar acortamiento del músculo y se preincubaron durante 45 min en 3 ml de tampón de bicarbonato oxigenado (95 % de oxígeno: 5 % de dióxido de carbono) de Krebs–Henseleit (pH 7,4) que contiene glucosa 5mM y cicloheximida 0,5 mM. La degradación de proteínas se determinó mediante la liberación de tirosina en un período de 2 horas como se describe en Waalkes, T.P. et al. A fluorimetric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. *J. Lab. Clin. Med.*, 50: 733–736, 1957.

La actividad del proteasoma funcional se determinó midiendo la actividad de la enzima de "tipo quimotripsina", la actividad proteolítica predominante de las subunidades β del proteasoma de acuerdo con el método de Orino, E. et al. ATP-dependent reversible association of proteasomes with multiple protein components to form 26S complexes that degrade ubiquitinated proteins in human HL-60 cells. *FEBS Lett.*, 284: 206–210, 1991. Los músculos se lavaron con PBS enfriado con hielo, se picaron y se sometieron a ultrasonidos en Tris.HCl 20 mM, pH 7,5, ATP 2mM, MgCl₂ 5 mM y DTT 1mM. Después, la fracción sonicada se centrifugó durante 10 minutos a 18.000 g, a 4 °C y el sobrenadante se utilizó para determinar la actividad enzimática de "tipo quimotripsina" mediante la liberación de aminometil cumarina (AMC) del sustrato fluorogénico succinil – LLVY – AMC. La actividad se midió en ausencia y presencia del inhibidor del proteasoma específico del proteasoma lactacistina (10 μ M). Solo la actividad suprimible de lactacistina se consideró como específica del proteasoma.

Para las muestras de transferencia de tipo Western de la proteína citosólica del músculo sóleo (de 2 a 5 μ g), obtenidos a partir del ensayo anterior, se resolvieron en 10 % de SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m (Hybond™, Amersham Life Science Products, Bucks, Reino Unido), que se habían bloqueado con Marvel al 5 % en PBS. Los anticuerpos primarios para MSS1 y p42 se utilizaron a una dilución de 1:5000, para las subunidades α del proteasoma 20S en 1: 1500 y las subunidades β a 1:1.000, mientras que el anticuerpo para E2_{14k} se utilizó a una dilución de 1:500. Los anticuerpos secundarios se usaron a una dilución de 1:2000. Los anticuerpos monoclonales de ratón para las subunidades α 1, 2, 3, 5, 6 y 7 del proteasoma 20 S (clon MCP 231), la subunidad β 3 del proteasoma 20S (HC10), la subunidad Rpt1 de ATPasa del regulador 19S (S7, Mss1; clon MSS1-104) y la subunidad Rpt4 de ATPasa del regulador 19S (S106, p42; clon p42-23) se adquirieron en Affiniti Research Products, Exeter, Reino Unido. Los antisueros policlonales de conejo frente a la enzima de conjugación con ubiquitina E2 (anticuerpo anti-UBC2) fue un regalo del Dr. Simon Wing, McGill University, Montreal, Quebec, Canadá. Los anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa se adquirieron en Dako Ltd., Cambridge, Reino Unido. La incubación se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente y se desarrolló mediante quimioluminiscencia. (ECL; Amersham).

Una relación dosis-respuesta de HMB en la pérdida de peso en ratones portadores del tumor MAC16 se muestra en la Figura 2. Las dosis de HMB mayores que 0,125 g/kg causaron una reducción significativa en la pérdida de peso (Figura 2A). Las diferencias con el grupo de control se indican como a, p <0,05; b, p <0,01 y c, p <0,005. La atenuación de la pérdida de peso no se acompañó de una alteración en la ingesta de alimentos y agua. Un nivel de dosis de 0,25 g/kg se eligió para todos los experimentos posteriores. El efecto de HMB, EPA y la combinación de HMB y EPA sobre la pérdida de peso en ratones caquécticos portadores de tumores MAC16 se muestra en la Figura 3. Las diferencias con el grupo de control se indican como a, p <0,05; b, p <0,01 ó e, p <0,005. Una dosis subóptima de la EPA se eligió para investigar las interacciones con HMB. Todos los tratamientos causó un aumento significativo en el peso del músculo sóleo (Figura 4A), y una reducción significativa en la liberación de tirosina (Figura 4B), lo que indica una reducción en la degradación de proteínas totales. Las diferencias con el grupo de control PBS se indican como a, p <0,05, b, p <0,01 o c, p <0,005. A las dosis elegidas, el HMB fue tan eficaz como el EPA.

Se ha demostrado que la expresión del proteasoma está elevada en los músculos gastrocnemio de los ratones portadores del tumor MAC16 y se ha demostrado que EPA atenúa este aumento de la expresión génica. Los resultados de la Figura 5 muestran que el HMB atenúa la actividad del proteasoma funcional, tal como se está determinada por la actividad de la enzima de "tipo quimotripsina", en la misma medida que el EPA a las dosis elegidas, y que la combinación de HMB y EPA no producía una depresión mayor de la actividad. Las diferencias con

el control se indican como c, $p < 0,005$. La expresión proteica de las subunidades del proteasoma se analizó mediante transferencia de Western de los sobrenadantes de los tejidos musculares sonicados. Tanto HMB como EPA atenuaron la expresión de las subunidades α del proteasoma 20S, las unidades estructurales del proteasoma, y había alguna indicación de una disminución adicional de la banda 2 para la combinación (Figura 6A). Las diferencias con respecto al control se muestran como c, $p < 0,001$, mientras que las diferencias con respecto a HMB se muestran como e, $p < 0,01$. La expresión de los proteasoma 20S beta subunidades, tanto HMB como EPA también atenuaron la expresión de las subunidades β del proteasoma 20S, las unidades estructurales del proteasoma, pero la combinación fue más eficaz que cualquier agente por separado (Figura 6B). Las diferencias con respecto a los controles se muestran como c, $p < 0,001$.

La expresión de MSS1, una subunidad de la ATPasa del complejo regulador del proteasoma 19S se muestra en la Figura 7A. Tanto HMB como EPA atenuaron la expresión de MSS1, pero la combinación no parece que produjera una reducción adicional. Se obtuvieron resultados similares con p42, otra subunidad ATPasa del regulador 19S, que estimula la asociación dependiente de ATP del proteasoma 20S con el regulador de los 19S para formar el proteasoma 26S (Figura 7B). Las diferencias con respecto al control se muestran como c, $p < 0,001$. Una vez más, tanto HMB y EPA parecían ser igualmente efectivos, mientras que la combinación pareció reducir la expresión de p42 más. Tanto HMB como EPA redujeron también la expresión de la enzima de conjugación de ubiquitina, E2_{14k}, mientras que la combinación provocó una reducción adicional de la expresión (Figura 8). Las diferencias con respecto al control se muestran como b, $p < 0,01$ y c, $p < 0,001$, mientras que las diferencias con respecto a HMB solo se muestran como d, $p < 0,05$ y f, $p < 0,001$. Estos resultados confirman que HMB es tan eficaz como EPA en la atenuación de la pérdida de masa muscular, la degradación de proteínas y la regulación por disminución de la ruta proteolítica ubiquitina-proteasoma, y este mecanismo parece ser responsable de la preservación de la masa muscular en ratones caquécticos portadores del tumor MAC 16.

Este estudio ha demostrado que el HMB es eficaz en la atenuación del desarrollo de caquexia o la pérdida involuntaria de peso en ratones portadores del tumor MAC16 y produjo una reducción de la degradación de proteínas en el músculo esquelético mediante regulación por disminución de la expresión aumentada de la ruta de la ubiquitina-proteasoma. Por lo tanto, el HMB es tan eficaz como el EPA en la reducción de la expresión de proteínas de las subunidades α y β del proteasoma 20S, así como dos subunidades del regulador 19S MSS1 19S y p42, la expresión de E2_{14k} y la actividad proteolítica del proteasoma.

Ejemplo II

Atenuación del crecimiento tumoral en animales

El estudio animal descrito en el Ejemplo I anterior también evaluó el efecto del HMB sobre la velocidad de crecimiento del tumor en ratones portadores del tumor MAC 16 caquécticos. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo I.

Una relación dosis-respuesta de HMB solo sobre la velocidad de crecimiento del tumor en ratones portadores del tumor MAC16 se muestra en la Figura 2B. Las diferencias con respecto al grupo de control se indican como a, $p < 0,05$; b, $p < 0,01$ y c, $p < 0,005$. Las dosis de HMB mayores que 0,125 g/kg causaron una reducción significativa en la velocidad del crecimiento del tumor. La atenuación del crecimiento del tumor no se acompañó de alteraciones en la ingesta de alimentos y agua.

Ejemplo III

Atenuación de la degradación de proteínas en miotubos murinos

Este estudio examina el efecto de HMB en la degradación de proteínas inducida por PIF y las rutas de señalización en los miotubos murinos para determinar el mecanismo de la atenuación de la expresión aumentada de la ruta proteolítica ubiquitina-proteasoma.

Los miotubos C₂C₁₂ se pasaron de forma rutinaria en DMEM suplementado con 10 % de FCS, glutamina y 1 % de penicilina-estreptomina en una atmósfera de 10 % CO₂ en aire a 37 °C. Los miotubos se formaron permitiendo que cultivos confluentes se diferenciaron en DMEM que contenía 2 % de HS, con cambios de medio cada 2 días.

El PIF se purificó a partir de tumores sólidos MAC16 (Todorov, P. et al. Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature*, 379: 739–742, 1996.) Extirpados de los ratones con una pérdida de peso de 20 a 25 %. Los tumores se homogeneizaron en Tris-HCl 10 mM a pH 8,0, que contiene fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,5 mM, EGTA 0,5 mM y ditiotreitól 1 mM a una concentración de 5 ml/g de tumor. Se añadió sulfato de amonio sólido a 40 % en p/v y el sobrenadante, después de la eliminación del sulfato de amonio, se sometió a cromatografía de afinidad usando anticuerpo monoclonal anti-PIF acoplado a una matriz sólida como se describe en Todorov, P. et al Induction of muscle protein degradation and weight loss by a tumor product. *Cancer Res.*, 56: 1256–1261, 1996. Las fracciones inmunógenas se concentraron y se utilizaron para estudios adicionales.

Los miotubos en multiplacas de seis pocillos se marcaron con L-[2,6³H] fenilalanina (0,67mCi/mmol) durante 24 horas en 2 ml de DMEM que contiene 2 % de HS. Después se lavaron tres veces en PBS, seguido de una incubación de 2 horas a 37 ° C en DMEM sin rojo fenol hasta que no apareció más radiactividad en el sobrenadante. Estos miotubos se incubaron adicionalmente durante 24 horas en el presencia de PIF, con y sin EPA o HMB, en DMEM fresco sin rojo fenol, para evitar la extinción de los recuentos, y en presencia de fenilalanina 2 mM fría para evitar la reincorporación de la radiactividad. La cantidad de radiactividad liberada en el medio se expresó como una porcentaje de cultivos de control no expuestos a PIF para determinar la degradación de proteínas totales.

Para la medición de la liberación de ácido araquidónico, los miotubos en multiplacas de seis pocillos que contienen 2ml de DMEM con 2 % de HS se marcaron durante 24 horas con ácido araquidónico 10 µM (que contiene 1 µCi de [³H]] araquidonato/ml) (Smith, H. et al. Effect of a cancer cachectic factor on protein synthesis/degradation in murine C2C12 myoblasts: Modulation by eicosapentaenoic acid. *Cancer Res.*, 59: 5507–6513, 1999). Después, las células se lavaron extensamente con PBS para eliminar los restos de incorporada de [³H]] araquidonato no incorporado y se añadió EPA o HMB 2 horas antes del PIF. Después de 24 horas más, se retiró 1 ml de medio para determinar la radioactividad liberada.

La actividad funcional de las subunidades β del proteasoma se determinó como la actividad de la enzima de "tipo quimotripsina" obtenida fluorimétricamente de acuerdo con el método de Orino, E. et al. ATP-dependent reversible association of proteasomes with multiple protein components to form 26S complexes that degrade ubiquitinated proteins in human HL-60 cells. *FEBS Lett.*, 284: 206–210, 1991. Los miotubos se expusieron a PIF durante 24 horas con o sin la EPA o HMB añadido 2 horas antes del PIF y se determinó la actividad enzimática en una fracción del sobrenadante (Whitehouse, A.S. et al. Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF-κB. *Br. J. Cancer*, 89: 1116–1122, 2003) mediante la liberación de aminometil cumarina (AMC) desde succinil-LLVY-AMC (0,1 mM) en presencia o ausencia del inhibidor específico del proteasoma lactacistina (10 µM) (Fenteany, G. et al. Lactacystin, proteasome function and cell fate. *J. Biol. Chem.*, 273: 8545–8548.199 8). Sólo la actividad suprimible de lactacistina se consideró como específica del proteasoma. Actividad se ajustó para la concentración de proteínas de la muestra, determinada utilizando el ensayo de Bradford (Sigma Chemical Co., Dorset, Reino Unido) usando seroalbúmina bovina como patrón.

Para el análisis de transferencia de tipo Western, la proteína citosólica (2 a 5 µg) obtenida para el ensayo anterior se resolvieron en 10 % de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm, que se había bloqueado con 5 % de Marvel en PBS, a 4 ° C durante la noche. Los anticuerpos primarios se utilizaron a una dilución de 1:100 (anti-actina y PKC_α); 1:500 (anti-ERK1 y 2); 1:1000 (anti-subunidad β del proteasoma 20S y I-κB_β); 1:1.500 (anti-subunidad α del proteasoma 20S) o 1:5.000 (anti-p42), mientras que los anticuerpos secundarios se usaron a una dilución de 1:2000. La incubación se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente y el desarrollo fue por ECL. La carga se cuantificó mediante la concentración de actina.

Las proteínas de unión al ADN se extrajeron de miotubos por el método de Andrews, NC et al. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 19:2499, 1991, que usa lisis hipotónica, seguido de niveles altos de sales de los núcleos. El ensayo de unión EMSA (ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética) se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Dado que se piensa que la degradación y la activación de proteínas de la ruta proteolítica ubiquitina-proteasoma en ratones portadores del tumor MAC16 está mediada por PIF, se llevaron a cabo estudios mecánicos sobre el efecto de HMB en la degradación de proteínas se llevaron a cabo en miotubos murinos tratados con PIF. La degradación de las proteínas totales inducida por PIF con una curva dosis-respuesta con una forma de campana típica, como informaron anteriormente Gomes-Marcondes, et al., Development of an in-vitro model system to investigate the mecanismo of muscle protein catabolism induced by proteolysis-inducing factor. *Br. J. Cancer*, 86: 1628-1633, 2002 con un efecto máximo a 4 nM. El efecto de EPA se ha mostrado previamente en Smith, H.J. et al. Effect of a cancer cachectic factor on protein synthesis/degradation in murine C2C12 myoblasts: Modulation by eicosapentaenoic acid. *Cancer Res.*, 59: 5507–5513, 1999; Whitehouse, A.S. et al. Induction of protein catabolism In myotubes by 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid through increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway. *Br. J. Cancer*, 89: 737–746, 2003; y Whitehouse, A.S. et al. El aumento de la expresión de la ruta de la ubiquitina-proteasoma en miotubos murinos por el factor inductor de la proteólisis (PIF) se asocia con la activación del factor de transcripción NF-κB. *Br. J. Cancer*, 89:1116–1122, 2003) para ser eficaz a 50 µM y los datos de la Figura 9A muestran que a una concentración de 50 µM tanto de HMB como de EPA fueron igualmente eficaces en lo que respecta a la atenuación de la degradación de proteínas inducida por PIF. También se produjo alguna atenuación con HMB a 25µM HMB a concentraciones bajas de PIF, pero no a concentraciones altas. Las diferencias con respecto al control en ausencia de PIF se indican como p <0,005, mientras que las diferencias con respecto al control con PIF (para grupos con adiciones de HMB o EPA) se indican como b, p <0,01 y c, p <0,005.

Anteriormente, se demostró que la degradación de proteínas inducida por PIF se debe a un aumento de la expresión de los componentes reguladores de la ruta proteolítica ubiquitina-proteasoma en Lorite, M.J., Smith, H.J., Arnold, J.A., Morris, A., Thompson, M.G. y Tisdale, M. J. Activation of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal

muscle in vivo and murine myoblasts in vitro by a proteolysis-inducing factor (PIF). Br. J. Cancer, 85: 297–302, 2001 and Gomes–Marcondes, M.C.C., Smith, H.J., Cooper, J.C. y Tisdale, M.J. Development of an in-vitro model system to investigate the mechanism of muscle protein catabolism induced by proteolysis-inducing factor. Br. J. Cancer, 86: 628–1633, 2002.

5 La actividad funcional de esta ruta se mide mediante la actividad enzimática de “tipo quimotripsina”, la actividad proteolítica predominante de las subunidades β del proteasoma. El PIF indujo un aumento de la actividad enzimática “de tipo quimotripsina”, que fue máxima a 4,2 nM. El efecto del PIF se atenuó completamente con EPA 50 μ M y HMB tanto a 25 como a 50 μ M. (Figura 9B, las diferencias con respecto al control se muestran como, $p < 0,001$, mientras que las diferencias en presencia de EPA o HMB se muestran como b, $p < 0,001$). Se observó un efecto similar sobre la expresión de las subunidades α , las subunidades beta y p42 del proteasoma, una subunidad de la ATPasa del regulador 19S que estimula la asociación dependiente de ATP del proteasoma 20S con el regulador 19S para formar el proteasoma 26S (Fig. 10). En todos los casos, el PIF aumentó la expresión a 4,2 y 10 nM y esta fue atenuada por EPA y HMB a 50 μ M, pero no a 25 μ M. Estos resultados confirman que HMB atenúa la degradación de proteínas a través de un efecto sobre la inducción por PIF de la ruta de la ubiquitina-proteasoma.

Ejemplo IV

Efecto sobre la actividad del mediador de la señalización en la inflamación y la proteólisis

20 El estudio *in vitro* descrito en el Ejemplo III anterior también evaluó el efecto de HMB sobre moléculas que son mediadores clave en la ruta de la inflamación. Este experimento se realizó como se describe en el Ejemplo III.

25 Se ha demostrado que la activación de la PKC activa la cascada de la cinasa regulada por señal extracelular (ERK) de las rutas de señalización de MAPK (Toker, A. Signalling through protein kinase C. Front. Biosci., 3:1134–1147, 1998; Wolf, I y Seger, R. The mitogen-activated protein kinase signalling cascade: from bench to bedside. IMAJ., 4:641–647). Las ERK activadas, por ejemplo, ERK1 (o MAPK de p44) y ERK2 (MAPK de p42), son capaces de fosforilar y, por lo tanto, activar la fosfolipasa citosólica A2, la enzima limitante de la velocidad en las rutas que implican la liberación de ácido araquidónico en la inflamación. Además, se ha demostrado que el PIF induce la fosforilación de la MAPK de p42/44, mientras que la MAPK total se mantuvo sin cambios y que participa en la expresión del proteasoma inducida por PIF (Smith, H.J. et al. Signal transduction pathways Involved in proteolysis-inducing factor induced proteasome expression in murine myotubes. Br. J. Cancer, 89:1783–1788, 2003). El efecto de EPA y HMB en este proceso se muestra en la Figura 12. PIF indujo un aumento de la fosforilación de p42/44 que fue máxima a 4,2 nM y este efecto se vio completamente atenuado tanto por EPA como por HMB a 50 μ M, pero no por HMB a 25 μ M. La capacidad de HMB para atenuar la fosforilación de ERK 1/2 puede ser importante en la inhibición por HMB de la expresión del proteasoma inducida por PIF.

40 Los experimentos realizados con mutantes de PKC, así como inhibidores de esta enzima, muestran que esta forma un mediador central de la señalización intracelular por PIF. Es probable que la PKC esté implicada en la fosforilación (y degradación) de I- κ B α que da lugar a la acumulación nuclear de NF- κ B y a un aumento de la transcripción génica. El PIF estimula la translocación de PKC α desde el citoplasma a la membrana plasmática (Fig. 11), lo que da lugar a la activación con un efecto máximo a 4,2nM de PIF en lo que respecta a la degradación de proteínas (Fig. 9). Tanto EPA como HMB a 50 μ M atenuaron este efecto con eficacia; mientras que HMB fue menos eficaz a 25 μ M (Fig. 11). Esto sugiere que la estimulación inducida por PIF de la PKC es atenuado por HMB a través de la inhibición de PKC.

45 Como se ha indicado anteriormente, el PIF induce la degradación de I- κ B α y estimula la acumulación nuclear de NF- κ B y se ha demostrado que este proceso es atenuado por EPA 50 μ M (Whitehouse, A.S. et al. increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway In murine myotubes by proteolysis-inducing factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF- κ B. Br. J. Cancer, 89:1116–1122.200 3). Los resultados en la Figura 13A muestran que HMB a 50 μ M atenúa eficazmente la degradación de I- κ B α en presencia de PIF en miotubos murinos e impide la acumulación nuclear de NF- κ B (Figura 13C). Las diferencias con respecto a PIF 0 nM se muestran como b, $p < 0,01$ y c, $p < 0,001$. Sólo se observó una inhibición parcial de la unión de NF- κ B al ADN cuando se utilizó HMB a una concentración de 25 μ M (Figura 13B). Las diferencias con respecto a PIF 0 nM son b = $p < 0,01$ y c = $p < 0,001$. Las diferencias entre HMB 50uM y PIF se trataron frente a PIF solo a la misma concentración e = $p < 0,01$ y f = $p < 0,001$. Estos resultados sugieren que el efecto global de HMB es comparable con el de EPA en la prevención del movimiento de NF- κ B hacia el núcleo con la activación concomitante de la expresión génica.

60 Por lo tanto, parece que HMB es un agente eficaz en el tratamiento de la inflamación inducida por citocinas y la pérdida de masa muscular en la caquexia por cáncer. Parece que HMB ejerce su efecto mediante la inhibición de la actividad de la PKC y la estabilización resultante del complejo I κ B/NF- κ B en el citoplasma. Dado que estas moléculas son mediadores clave en la ruta de la inflamación, parece que HMB es un compuesto antiinflamatorio.

Ejemplo V (ejemplo de referencia)**Composición de un producto nutricional para evitar la pérdida involuntaria de peso**

- 5 La lista de materiales específica para fabricar el producto nutricional de este ejemplo se presenta en la Tabla 1. Por supuesto, se pueden realizar diversos cambios en los ingredientes y cantidades específicos sin apartarse del alcance de la invención.

TABLA 1: LISTA DE MATERIALES INGREDIENTE	CANTIDAD (KG)
AGUA	316
PREMEZCLA DE MINERALES TRAZA/ULTRATRAZA	0,06
SULFATO DE CINC	0,033
SULFATO DE MANGANESO	0,0082
MOLIBDATO DE SODIO	0,00023
CLORURO DE CROMO	0,00029
SELENITO DE SODIO	0,000098
CLORURO DE POTASIO	0,072
CITRATO DE SODIO	2,89
YODURO DE POTASIO	0,00009
CITRATO DE POTASIO	1,5
JARABE DE MAÍZ	7,68
MALTODEXTRINA	53,6
FOSFATO DE MAGNESIO DIBÁSICO	0,26
FOSFATO DE CALCIO TRLBÁSICO	0,99
CLORURO DE MAGNESIO	1,2
SACAROSA	11,9
FRUCTOOLIGOSACÁRIDO	5,9
TRIGLICÉRIDO DE CADENA MEDIA	2,6
ACEITE DE CANOLA	1,6
ACEITE DE SOJA	0,87
57 % DE PALMITATO DE VITAMINA A	0,007
PREMEZCLA DE VITAMINAS DEK	0,04
VITAMINA D	0,000088
ACETATO DE D-ALFA-TOCOFEROL	0,036
FILOQUINONA	0,00006
CARRAGENANO	0,03
LECITINA DE SOJA	0,6
CASEINATO DE SODIO	15,5
CASEINATO DE CALCIO	4,2
HMB DE CALCIO MONOHIDRATO	2,6
AISLADO DE PROTEÍNA DE LA LECHE	14
ACEITE DE SARDINA DESODORIZADO REFINADO	6,9
ÁCIDO ASCÓRBICO	0,12
45 % DE HIDRÓXIDO DE POTASIO	0,13
TAURINA	0,12
PREMEZCLA DE DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES	0,11
NIACINAMIDA	0,017
PANTOTENATO DE CALCIO	0,01
CLORURO DE TIAMINA HIDROCLORURO	0,003
HIDROCLORURO DE PIRIDOXINA	0,003
RIBOFLAVINA	0,002
ÁCIDO FÓLICO	0,0004
BIOTINA	0,00034
CIANOCOBALAMINA	0,000038
PALMITATO DE ASCORBILO	0,03
CLORURO DE COLINA	0,25
L-CARNITINA	0,0681
MALVAVISCO DE VANILLA N&A	1,6
DULCE DE LECHE N&A	0,27

10

El producto nutricional líquido de la presente invención se fabricó preparando tres suspensiones que se mezclan, se combinan con aceite de sardina desodorizado refinado, se tratan con calor, se normalizan, se envasan y se esterilizan. El proceso para la fabricación de 454 kg (1.000 libras) del producto nutricional líquido, utilizando la Lista de Materiales de la Tabla 7, se describe con detalle a continuación.

Una suspensión de carbohidrato/mineral se prepara calentando en primer lugar aproximadamente 62,6 kg de agua a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 71 °C a 77 °C con agitación. El HMB se añade al agua y se disuelve mediante agitación de la solución resultante durante al menos cinco minutos. Se añade al agua la cantidad requerida de citrato de potasio y la premezcla de minerales traza/ultratraza y se disuelve mediante agitación de la solución resultante durante al menos 10 minutos. A continuación se añaden los siguientes minerales, en el orden indicado, con agitación alta: cloruro de magnesio, cloruro de potasio, citrato de sodio, yoduro de potasio, fosfato de magnesio y fosfato tricálcico. Se deja mezclar la suspensión con agitación moderada hasta que se disuelve o dispersa por completo. Después se añaden el jarabe de maíz, la sacarosa y la maltodextrina a la suspensión con agitación. Se añaden la cantidad requerida de FOS y se deja que se mezcle. La suspensión de hidratos de carbono/minerales completada mantiene con agitación alta a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 60 a 66 °C durante no más de 8 horas hasta que se mezcle con las demás suspensiones.

Una suspensión de aceite se prepara combinando y calentando los triglicéridos de cadena media (aceite de coco fraccionado), aceite de canola y aceite de soja a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 32 – 43 °C con agitación. Se añade la premezcla de vitaminas DEK y se deja que se mezclen hasta su dispersión completa. Se añaden las cantidades requeridas de los ingredientes siguientes: lecitina de soja, vitamina A, palmitato de ascorbilo y vitamina E. Se añade el carragenano y se deja mezclar hasta su completa dispersión. La suspensión de aceite completada mantiene con agitación moderada una temperatura en el intervalo de aproximadamente 32 – 43 °C durante no más de 8 horas hasta que se mezcle con las demás suspensiones.

Una suspensión de proteínas se prepara calentando en primer lugar aproximadamente 196,78 kg de agua a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 60 – 63 °C con agitación. El caseinato de calcio y el caseinato de sodio y el aislado de proteínas de la leche se mezclan en la suspensión usando un aparato de mezclado. La suspensión de proteínas completada mantiene con agitación una temperatura en el intervalo de aproximadamente 54 – 60 °C durante no más de 2 horas antes de mezclar con las demás suspensiones.

La suspensión de aceite y proteínas se mezcla con agitación y la suspensión mezclada resultante se mantiene a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 54 – 66 °C. Después de esperar durante al menos cinco minutos, se añade la suspensión de carbohidrato/mineral a la suspensión mezclada de la etapa anterior con agitación y la suspensión mezclada resultante se mantiene a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 54 – 66 °C. A continuación se añade a la suspensión el aceite de sardina desodorizado refinado con agitación. (En un método más preferido de fabricación, el aceite de sardina se dosificaría lentamente en el producto a medida que la mezcla pasa a través de un conducto a una velocidad constante). Preferentemente, el pH de la suspensión mezclada se determina después de al menos 5 minutos. Si el pH de la suspensión mezclada es inferior a 6,55, se ajusta con hidróxido de potasio diluido hasta un pH de 6,5 a 6,8.

Después de esperar un período de no menos de un minuto ni de más de dos horas, la suspensión mezclada se somete a desaireación, tratamiento a temperatura ultraalta y homogeneización, tal como se describe de la siguiente manera: usar una bomba positiva para suministrar la suspensión mezclada para este procedimiento; calentar la suspensión mezclada a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 66 – 71 °C; desairear la suspensión mezclada a 25,4 - 38,1 cm de Hg; emulsionar la suspensión mezclada a 61 – 75 atmósferas; calentar la suspensión mezclada a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 120 – 122 °C pasándola a través de un intercambiador de calor de placas/bobina con un tiempo de retención de aproximadamente 10 segundos; calentar UHT la suspensión mezclada hasta una temperatura en el intervalo de aproximadamente 144 – 147 °C con un tiempo de retención de aproximadamente 5 segundos; reducir la temperatura de la suspensión mezclada para que esté en el intervalo de aproximadamente 120 – 122 °C pasándola a través de un enfriador ultrarrápido; reducir la temperatura de la suspensión mezclada para que esté en el intervalo de aproximadamente 71 – 82 °C pasándola a través de un intercambiador de calor de placas/bobina; homogeneizar la suspensión mezclada a aproximadamente 265 – 266 atmósferas; pasar la suspensión mezclada a través de un tubo de retención durante al menos 16 segundos a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 74 – 85 °C; y enfriar la suspensión mezclada hasta una temperatura en el intervalo de aproximadamente 1 – 70 °C pasándola a través de un intercambiador de calor grande.

Almacenar la suspensión mezclada a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 1 – 7 °C, preferentemente con agitación.

Preferentemente, en este momento se lleva a cabo un examen analítico apropiado para el control de calidad. En base a los resultados de la prueba se añade una cantidad apropiada de agua de dilución (10 - 38 °C) a la suspensión mezclada con agitación.

Una solución de vitaminas y una solución de sabor se preparan por separado y luego se añaden a la suspensión mezclada.

La solución de vitaminas se prepara calentando aproximadamente 3,94 kg de agua a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 43 - 66 °C con agitación y añadiendo posteriormente los siguientes ingredientes, en el orden indicado: ácido ascórbico, 45 % de hidróxido de potasio, taurina, premezcla de vitaminas hidrosolubles, cloruro de

colina y L-Carnitina. Después se añade la solución de vitaminas a la suspensión mezclada con agitación.

La solución de sabor se prepara mediante la adición de sabor de malvavisco y dulce de leche a aproximadamente 7,94 kg de agua con agitación. Un producto nutricional de acuerdo con la presente invención se ha fabricado con un sabor artificial de malvavisco distribuido por Firmenich Inc., Princeton, Nueva Jersey, EE.UU. y un sabor de dulce de leche natural y artificial distribuido por Firmenich Inc. A continuación se añade la solución de sabor a la suspensión mezclada con agitación.

Si fuera necesario, se añade a la suspensión mezclada hidróxido de potasio diluido, de manera que el producto tendrá un pH en el intervalo de 6,4 a 7,0 después de la esterilización. Después, el producto completado se introduce en recipientes adecuados y se somete a esterilización. Por supuesto, si se desea se podría emplear un procesamiento aséptico.

Ejemplo VI

Composición de un producto nutricional para el control de respuesta glucémica

En la tabla 2 se presenta una lista de materiales para la fabricación de 1.000 kg de un producto nutricional líquido, que proporciona nutrientes a una persona, pero limita la respuesta de insulina resultante. A continuación se expone una descripción detallada de su fabricación.

Tabla 2: Lista de materiales para un líquido nutricional

Ingrediente	Cantidad por cada 1.000 kg
Agua	c.s.
Maltodextrina	56 kg
Caseína ácida	41,093 kg
Fructosa	28 kg
Aceite de cártamo rico en oleico	27,2 kg
Jarabe de maltitol	16 kg
Maltitol	12,632 kg
Fibersol® 2(E)	8,421 kg
Caseinato	6,043 kg
Fructooligosacárido	4,607 kg
Polisacárido de soja	4,3 kg
Aceite de canola	3,2 kg
Fosfato tricálcico	2,8 kg
Cloruro de magnesio	2,4 kg
Lecitina	1,6 kg
Citrato de sodio	1,18 kg
Citrato de potasio	1,146 kg
Hidróxido sódico	1,134 kg
Fosfato de magnesio	1,028 kg
HMB de calcio monohidrato	5,7 kg
m-inositol	914,5 g
Vitamina C	584 g
Cloruro de potasio	530 g
Cloruro de colina	472,1 g
45 % de hidróxido de potasio	402,5 g
Premezcla de UTM/TM	369,3 g
Fosfato de potasio	333 g
Carnitina	230,5 g
Goma gellan	125 g
Taurina	100,1 g
Vitamina E	99 g
Ésteres de luteína (5 %)	92 g

Ingrediente	Cantidad por cada 1.000 kg
Premezcla WSV	75,4 g
Premezcla de vitaminas DEK	65,34 g
30 % de Beta caroteno	8,9 g
Vitamina A	8,04 g
Hidrocloruro de piridoxina	3,7 g
Cloruro de cromo	1,22 g
Ácido fólico	0,64 g
Yoduro de potasio	0,20 g
Cianocobalamina	0,013 g
<p>Premezcla de WSV (por g de premezcla): 375 mg/g DE niacinamida, 242 mg/g de pantotenato de calcio, 8,4/g de ácido g fólico, 62 mg/g de cloruro de tiamina hidrocloruro, 48,4 g/g de riboflavina, 59,6 mg/g de hidrocloruro de piridoxina, 165 mcg/g de cianocobalamina y 7305 mcg/g de biotina.</p> <p>Premezcla de vitaminas DEK (por g de premezcla): 8130 UI/g de vitamina D₃, 838 UI/g de vitamina e, 1,42 mg/g de vitamina K₁; Premezcla de UTM TM (por g de premezcla): 45,6 mg/g de cinc, 54 mg/g de hierro, 15,7 de manganeso, 6,39 mg/g de cobre, 222 mcg/g de selenio, 301 mcg/g de cromo y 480 mcg/g molibdeno</p>	

Los productos nutricionales líquidos diabéticos de la presente invención se fabrican mediante la preparación de cuatro suspensiones que se mezclan, se tratan con calor, se normalizan, se envasan y se esterilizan.

- 5 Una suspensión de carbohidrato/mineral se prepara calentando en primer lugar aproximadamente 82 kg de agua a una temperatura de aproximadamente 65 °C a aproximadamente 71 °C con agitación. Con agitación, se añade la cantidad necesaria de HMB de calcio y se agita durante 5 minutos. Se añade la cantidad necesaria de citrato de sodio y goma gellan distribuidas por la Kelco, División de Merck and Company Incorporated, San Diego, California, EE.UU. y se agita durante 5 minutos. Se añade la cantidad requerida de la premezcla de minerales traza/minerales
- 10 ultratrazo UTM/TM) (distribuido por Fortitech, Schnectady, Nueva York). La suspensión es de color amarillo verdoso. La agitación se mantiene hasta que los minerales están completamente dispersos. Con agitación, se añaden las cantidades requeridas de los siguientes minerales: citrato de potasio, cloruro de potasio, cloruro de cromo, cloruro de magnesio y yoduro de potasio. A continuación, la primera maltodextrina distribuida por Grain Processing Corporation, Muscatine, Iowa, EE.UU. y la fructosa se añaden para suspender con agitación alta y se dejan
- 15 disolver. Con agitación, se añaden las cantidades necesarias de polvo de maltitol distribuido por Roquette America, Inc., Keokuk, Iowa, jarabe de maltitol distribuido por AlGroup Lonza, Fair Lawn, Nueva Jersey, fructooligosacáridos distribuidos por Golden Technologies Company, Golden, Colorado, EE.UU., y una segunda maltodextrina distribuida por Matsutani Chemical Industry Co., Hyogo, Japón, con el nombre del producto Fibersol[®] 2 (E) y se agita bien hasta que se disuelvan por completo. La cantidad requerida de fosfato tricálcico y de fosfato de magnesio se añade a la
- 20 suspensión con agitación. La suspensión de hidratos de carbono/minerales completada mantiene con agitación a una temperatura de aproximadamente 65 a aproximadamente 71 °C durante no más de doce horas hasta que se mezcle con las demás suspensiones.
- Una fibra en suspensión de aceite se prepara combinando y calentando las cantidades requeridas de aceite de cártamo rico en oleico y aceite de canola a una temperatura de aproximadamente 40,5 °C a aproximadamente 49 °C
- 25 con agitación. Con agitación se añaden las cantidades requeridas de ésteres de luteína de Cognis de LaGrange, Illinois. Agitar durante un mínimo de 15 minutos. Con agitación, se añaden al aceite calentado las cantidades requeridas de los siguientes minerales: Lecitina (distribuida por Central Soya Company, Fort Wayne, Indiana), premezcla de vitaminas D, E, K) distribuida por Vitamins Inc., Chicago, Illinois), vitamina A, vitamina E y beta-
- 30 caroteno. Las cantidades requeridas de polisacárido de soja distribuido por Protein Technology International, St. Louis, Missouri, se dispersan lentamente en el aceite caliente. La suspensión de aceite/fibra completada mantiene con agitación moderada una temperatura de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C durante un periodo de no más de doce horas hasta que se mezcla con las demás suspensiones.
- 35 Una primera proteína en suspensión acuosa se prepara calentando 293 kg de agua a 60 °C a 65 °C. Con agitación, se añade la cantidad requerida de solución de citrato de potasio al 20 % y se mantiene durante un minuto. Se añade la cantidad requerida de caseína ácida con agitación alta, seguida inmediatamente de la cantidad requerida de 20 % de hidróxido de sodio. La agitación se mantiene alta hasta que se disuelva la caseína. La suspensión se lleva a cabo de aproximadamente 60 °C a 65 °C con agitación moderada.
- 40 Una segunda proteína en suspensión acuosa se prepara calentando en primer lugar aproximadamente 77 kg de agua a una temperatura de aproximadamente 40 °C con agitación. Se añade el caseinato y la suspensión se agita bien hasta que el caseinato está completamente dispersado. Con agitación continua, la suspensión se calienta lentamente a 60 °C a 65 °C. La suspensión se mantiene durante no más de doce horas hasta que se mezcle con las
- 45 demás suspensiones.

El lote se ensambla mediante la mezcla de 344 kg de una suspensión de proteína con 84 kg de la suspensión de proteínas dos. Con agitación, se añaden los 37 kg de la suspensión de aceite/fibra. Después de esperar durante al menos un minuto, se añaden 216 kg de la suspensión de hidrato de carbono/mineral a la suspensión mezclada de la etapa anterior con agitación y la suspensión mezclada resultante se mantiene a una temperatura de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 60 °C. El pH del lote mezclado se ajusta a un pH de 6,45 a 6,75 con hidróxido de potasio 1 N.

Después de esperar durante un período de no menos de un minuto ni de más de dos horas, la suspensión mezclada se somete a desaireación, tratamiento a temperatura ultraalta y homogeneización. La suspensión mezclada se calienta a una temperatura de aproximadamente 71 °C a aproximadamente 82 °C y se desairea al vacío. Después, la suspensión caliente se emulsiona a través de un homogeneizador de una sola etapa a de 6,2 a 7,5 MPa. Después de la emulsificación, la suspensión se calienta a de aproximadamente 99° C a aproximadamente 110 °C y después se calienta a una temperatura de aproximadamente 146 °C durante aproximadamente 5 segundos. La suspensión se pasa a través de un refrigerador ultrarrápido para reducir la temperatura a de aproximadamente 99 °C a aproximadamente 110 °C y luego a través de un refrigerador de placas para reducir la temperatura a de aproximadamente 71 °C a aproximadamente 76 °C. La suspensión se homogeneiza después a de 26,8 a 28,2/2,7 a 4,1 MPa. La suspensión se mantiene a aproximadamente 74 °C a aproximadamente 80 °C durante 16 segundos y después se enfría a 1 °C a aproximadamente 7 °C. En este punto, se toman muestras para las pruebas microbiológicas y analíticas. La mezcla se mantiene en agitación.

La solución de vitaminas hidrosoluble (WSV) se prepara por separado y se añade a la suspensión mezclada procesada.

La solución de vitaminas se prepara mediante la adición de los siguientes ingredientes a 9,4 kg de agua con agitación: premezcla de WSV (distribuida por J.B. Laboratories, Holland, Michigan), vitamina C, cloruro de colina, L-carnitina, taurina, inositol, ácido fólico, piridoxina hidrocloreto y cianocobalamina. Se añade la cantidad requerida de La suspensión de hidróxido de potasio AL 45 % para llevar el pH a entre 7 y 10.

Basándose en los resultados analíticos de las pruebas de control de calidad, se añade al lote una cantidad apropiada de agua con agitación para alcanzar el total de sólidos deseado. Además, se añaden a la mezcla diluida 8,8 kg de la solución de vitamina con agitación.

El pH del producto puede ajustarse para conseguir una estabilidad óptima del producto. Después, el producto completado se introduce en recipientes adecuados y se somete a esterilización terminal.

35 Ejemplo VII

Composición de un producto nutricional pediátrico

En la tabla 3 se presenta una lista de materiales para la fabricación de 771 kg de un producto nutricional enteral pediátrico de la presente invención. A continuación se expone una descripción detallada de su fabricación.

Tabla 3: Lista de materiales para el producto nutricional pediátrico de vainilla

Ingrediente	Cantidad por 771 kg
Suspensión madre de PIF	
Aceite de cártamo oleico	40,7 kg
Aceite de soja	24,4 kg
Aceite de TCM	16,3 kg
Lecitina	840,2 g
Monoglicéridos	840,2 g
Carragenano	508,9 g
Caseinato	32,8 kg
Mezcla madre de OSV	
Premezcla de DEK	83,3 g
Vitamina A	7,1g
Ésteres de luteína (5 %)	92 g
Suspensión madre de PIW	
Agua	530 ka
Caseinato	11,3 kg
Proteína del suero de la leche	11,9 kg
Suspensión madre de MIN	

ES 2 586 402 T3

Ingrediente	Cantidad por 771 kg
Agua	18 kg
Goma de celulosa	1696 g
HMB de calcio monohidrato	4,4kg
Cloruro de magnesio	2,7 kg
Cloruro de potasio	10 kg
Citrato de potasio	2,7 kg
Yoduro de potasio	0,25 g
Fosfato de dipotasio	1,45 kg
Mezcla final	
Suspensión de PIW	251 kg
Suspensión de PIF	53 kg
Suspensión de MIN	12,6 kg
Cloruro de sodio	127,4 g
Sacarosa	77,6 kg
Fosfato tricálcico	2,5 kg
Agua	167 kg
Solución madre de WSV	
Agua	31,7 kg
Citrato de potasio	3,74 g
Premezcla de UTM/TM	172,2 g
Premezcla WSV	134,1 g
m-inositol	176,7g
Taurina	145,5 g
L-carnitina	34,92 g
Cloruro de colina	638,7 g
Solución madre de ácido ascórbico	
Agua	18,6 kg
Ácido ascórbico	550,0 g
KOH al 45 %	341 g
Solución madre de vainilla	
Agua	38,5 kg
Sabor de vainilla	4,3 kg
Premezcla de DEK: por premezcla g) 12.100 UI de vitamina D ₃ , 523 UI de vitamina E, 0.962 mg de vitamina K ₁ Premezcla de UTM/TM: por g de premezcla) 132 mg de cinc, 147 mg de hierro, 10,8 mg de manganeso, 12,5 mg de cobre, 0,328 mg de selenio, 0,284 mg de molibdeno Premezcla WSV: (por g de premezcla) 375 mg de niacinamida, 242 mg de d-pantotenato de calcio, 8,4 mg de ácido fólico, 62 mg de cloruro de tiamina hidrocloreuro, 48,4 mg de riboflavina, 59,6 mg hidrocloreuro de piridoxina, 165,5 mcg de cianocobalamina, 7305 mcg de biotina	

5 La mezcla de vitaminas liposolubles (mezcla OSV) se prepara pesando la cantidad especificada de la premezcla de DEK en un recipiente con tapón de rosca protegido de la lo bastante grande como para contener 54 g de vitaminas liposolubles. Usando una pipeta de plástico, se añade la cantidad requerida de vitamina A a la fracción alícuota de DEK. El recipiente se aclara con nitrógeno antes de aplicar la tapa.

10 La proteína madre en la suspensión grasa (PIF) se preparó añadiendo las cantidades requeridas de aceite de cártamo rico en oleico, aceite de soja y el aceite de TCM al tanque de mezcla. La mezcla se calienta a de 40,5 °C a 49 °C con agitación. Con agitación se añaden las cantidades requeridas de ésteres de luteína de American River Nutrition of Hadley, Massachusetts. Agitar durante un mínimo de 15 minutos. Se añaden los emulsionantes, lecitina (distribuida por Central Soya of Decatur, Indiana) y los monoglicéridos (distribuidos por Quest de Owings Mills, Maryland), y se mezclan bien para disolver. Después se añade toda la mezcla de OSV. Los recipientes se enjuagan de 4 a 5 veces con la mezcla de aceites para asegurar la transferencia completa de las vitaminas. Se añaden el carragenano (distribuido por FMC de Rockland, Maine) y el caseinato. La suspensión se mezcla bien para dispersar

la proteína. La suspensión de PIF se mantiene hasta seis horas a 60 - 65 °C con agitación moderada hasta su uso.

La proteína madre en la suspensión acuosa (PIW) se prepara mediante la adición de la cantidad requerida de agua a un tanque de mezcla. El agua se mantiene con agitación moderada y se lleva hasta 76 - 82 °C. Se añade al agua la cantidad necesaria de caseinato con agitación alta y se mezcla que la proteína se ha dispersado por completo. Se deja que la suspensión de proteínas se enfríe hasta 54 - 60 °C antes de continuar. Una vez enfriada, se añade la cantidad requerida de proteína de suero de la leche y se mezcla bien hasta que esté completamente dispersa/disuelta. La suspensión de PIW se mantiene hasta dos horas a 54 -60 °C hasta su uso.

La solución madre mineral (MIN) se prepara añadiendo la cantidad requerida de agua a un tanque de mezcla y se calienta a 60-68 °C. La mezcla de goma de celulosa (distribuida por FMC de Newark, Delaware) se añade al agua y se mantiene en agitación moderada durante un mínimo de cinco minutos antes de proceder. Se añade HMB de calcio y se agita durante un mínimo de cinco minutos antes de proceder. Las sales minerales cloruro de magnesio, cloruro de potasio, citrato de potasio, yoduro de potasio y fosfato de dipotasio se añaden de una en una, mezclando entre cada adición para asegurar la disolución de los minerales. La solución de MIN completada se mantiene a 54 - 65 °C con agitación de baja a moderada hasta su uso.

La mezcla final se prepara mediante la adición de la cantidad especificada de suspensión de PIW a un tanque de mezcla y se calienta con agitación a 54 -60 °C. Se añade la cantidad especificada de suspensión de PIF al tanque y se mezcla bien. Se añade a la mezcla la cantidad especificada de la solución de MIN y se mezcla bien. Se añade a la mezcla la cantidad especificada de cloruro de sodio y se mezcla bien. Se añade a la mezcla la cantidad especificada de sacarosa y se mezcla hasta su disolución. El fosfato tricálcico se añade a la mezcla y se mezcla bien para dispersar. Se añade a la mezcla la cantidad especificada de agua adicional y se mezcla bien. La mezcla final completada se mantiene en agitación continua a 54 - 60 °C. Si es necesario, el pH se ajusta a 6,45 - 6,8 con KOH 1 N.

Después de esperar durante un período de no menos de un minuto ni de más de dos horas, la suspensión mezclada se somete a desaireación, tratamiento a temperatura ultraalta y homogeneización. La suspensión mezclada se calienta a una temperatura de aproximadamente 68 °C a aproximadamente 74 °C y se desairea al vacío. La suspensión caliente se emulsiona después a 6,2 a 7,5 MPa. Después de la emulsificación, la suspensión se calienta de aproximadamente 120 °C a aproximadamente 122 °C y después se calienta a una temperatura de aproximadamente 149 °C a aproximadamente 150 °C. La suspensión se pasa a través de un refrigerador ultrarrápido para reducir la temperatura de desde aproximadamente 120 °C a aproximadamente 122 °C y luego a través de una placa de refrigeración para reducir la temperatura a de aproximadamente 74 °C a aproximadamente 79 °C. A continuación, la suspensión se homogeneiza a 26,8-28,2/2,7 a 4,1 MPa. La suspensión se mantiene a aproximadamente 74 °C a aproximadamente 85 °C durante 16 segundos y después se enfría a 1 °C a aproximadamente 6 °C. En este punto, se toman muestras para las pruebas microbiológicas y analíticas. La mezcla se mantiene en agitación.

La normalización procede de la siguiente manera. La solución madre de vitaminas (WSV) se prepara calentando la cantidad especificada de agua a 48 – 60 °C en un tanque de mezcla. El citrato de potasio, la premezcla de UTM/TM (distribuida por Fortitech of Schenectady, New York), la premezcla de WSV, m-inositol, taurina, L-carnitina y cloruro de colina se añadieron cada uno a la solución en el orden indicado y se dejaron mezclar bien para disolver o dispersar cada ingrediente. Se añaden 14,2 kg de la solución de vitaminas al tanque de mezcla procesada.

La solución madre de vainilla se prepara mediante la adición de la cantidad especificada de agua a un tanque de mezcla. Se añade la cantidad especificada de vainilla (distribuida por Givaudan Roure de Cincinnati, Ohio) al agua y se mezcla bien. Se añaden 18,5 kg de la solución de vainilla al depósito de mezcla procesada y se mezclaron bien.

La solución madre de ácido ascórbico se prepara mediante la adición de la cantidad requerida de agua a un tanque de mezcla. Se añade la cantidad especificada de ácido ascórbico y se mezcla bien para disolver. Se añade la cantidad especificada de KOH al 45 % y se mezcla bien. Se añaden 8,4 kg de la solución de ácido ascórbico al tanque de mezcla y se mezcla bien.

La mezcla final se diluye hasta los sólidos totales finales mediante la adición de 92,5 kg de agua y se mezcla bien. El producto se carga en recipientes adecuados previos a la esterilización terminal (autoclave).

Ejemplo VIII

Composición de un suplemento nutricional completo

En la tabla 4 se presenta una lista de materiales para la fabricación de 1.000 kg de un líquido sustituto de comidas con sabor a vainilla típico. A continuación se expone una descripción detallada de su fabricación.

Tabla 4: Lista de materiales para un producto nutricional de vainilla

Ingrediente	Cantidad por 1.000 kg
Agua	c.s.
Jarabe de maíz	33 kg
Maltodextrina	28 kg
Sacarosa	19,4 kg
Caseinato	8,7 kg
HMB de calcio monohidrato	5,7 kg
Aceite de cártamo rico en oleico	4,1 kg
Aceite de canola	4,1 kg
Proteína de soja	3,7 kg
Proteína del suero de la leche	3,2 kg
Caseinato	2,9 kg
Aceite de maíz	2,0 kg
Fosfato tricálcico	1,4 kg
Citrato de potasio	1,3 kg
Fosfato de magnesio	952 g
Lecitina	658 g
Cloruro de magnesio	558 g
Sabor de vainilla	544 g
Cloruro de sodio	272 g
Carragenano	227 g
Cloruro de colina	218 g
Premezcla de UTM/TM	165 g
Cloruro de potasio	146 g
Ácido ascórbico	145 g
Citrato sódico	119 g
Hidróxido de potasio	104 g
Luteína (5 %)	46 g
Premezcla de WSV	33 g
Premezcla de vitaminas DEK	29 g
Vitamina A	3,7 g
Yoduro de potasio	86 mcg
Premezcla de WSV (por g de premezcla): 376 mg/g DE niacinamida, 242 mg/g de pantotenato de calcio, 8,4/g de ácido g fólico, 62 mg/g de cloruro de tiamina hidrocloreuro, 48,4 g/g de riboflavina, 59,6 mg/g de hidrocloreuro de piridoxina, 165 mcg/g de cianocobalamina y 7305 mcg/g de biotina. Premezcla de vitaminas DEK (por g de premezcla): 8130 UI/g de vitamina D ₃ , 838 UI/g de vitamina E, 1,42 mg/g de vitamina K ₁ Premezcla de UTM/TM (por g de premezcla): 45,6 mg/g de cinc, 54 mg/g de hierro, 15,7 de manganeso, 6,39 mg/g de cobre, 222 mcg/g de selenio, 301 mcg/g de cromo y 480 mcg/g molibdeno	

Los productos sustitutos de comidas líquidos de la presente invención se fabrican mediante la preparación de tres suspensiones que se mezclan, se tratan con calor, se normalizan, se envasan y se esterilizan.

5

Una suspensión de carbohidrato/mineral se prepara calentando en primer lugar la cantidad requerida de agua a una temperatura de aproximadamente 65 °C a aproximadamente 71 °C con agitación. Se añade la cantidad requerida de HMB de calcio y se agita durante un mínimo de 5 minutos. Con agitación se añade la cantidad requerida de citrato de potasio y de la premezcla de minerales traza/minerales ultratrazas UTM/TM) (distribuido por Fortitech, Schnectady, Nueva York). La suspensión es de color amarillo verdoso. La agitación se mantiene hasta que los minerales están completamente dispersos. Con agitación, se añaden las cantidades requeridas de los siguientes minerales: cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, citrato de sodio, yoduro de potasio, fosfato de magnesio y fosfato tricálcico. A continuación, la maltodextrina distribuida por Grain Processing Corporation, Muscatine, Iowa, EE.UU., la sacarosa y el jarabe de maíz se añaden para suspender con agitación alta y se dejan disolver. La suspensión de hidratos de carbono/minerales completada mantiene con agitación a una temperatura de aproximadamente 65 a aproximadamente 71 °C durante no más de ocho horas hasta que se mezcle con las demás suspensiones.

10

15

Una suspensión de proteína en grasa (PIF) se prepara combinando y calentando las cantidades requeridas de aceite de cártamo rico en oleico y aceite de canola a una temperatura de aproximadamente 40,5 °C a aproximadamente 49 °C con agitación. Con agitación se añaden las cantidades necesarias de luteína libre de Kemin Foods of Des

20

Moines, Iowa. Agitar durante un mínimo de 15 minutos. Se añaden los siguientes ingredientes al aceite caliente: lecitina (distribuida por Central Soya Company, Fort Wayne, Indiana), vitamina A y premezcla de vitaminas D, E, K) distribuida por Vitamins Inc., Chicago, Illinois). La cantidad requerida de carragenano se mezcla en seco con la cantidad requerida de proteína de suero de la leche y se añade a la mezcla de lípidos con agitación y se deja con agitación durante un mínimo de 10 minutos. A la mezcla se añade la cantidad requerida de proteína de soja lentamente para asegurar una mezcla adecuada. La suspensión de aceite/proteína completada mantiene con agitación moderada una temperatura de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 43 °C durante un periodo de no más de doce horas hasta que se mezcla con las demás suspensiones.

10 Se prepara una suspensión de proteína en agua calentando en primer lugar aproximadamente la cantidad requerida de agua a una temperatura de aproximadamente 40 °C con agitación. Se añade el caseinato y la suspensión se agita bien hasta que el caseinato está completamente dispersado. Con agitación continua, la suspensión se calienta lentamente a 60 °C a 65 °C. La suspensión se mantiene durante no más de doce horas hasta que se mezcle con las demás suspensiones.

15 El lote se ensambla mediante la mezcla de la cantidad requerida de la suspensión proteica con la cantidad requerida de la suspensión de hidratos de carbono/minerales y se deja agitar durante 10 minutos. Con agitación, se añade la cantidad necesaria de la suspensión de aceite/proteínas y se agita durante al menos 10 minutos. El pH del lote mezclado se ajusta a un pH de 6,66 a 6,75 con hidróxido de potasio 1N.

20 Después de esperar durante un período de no menos de un minuto ni de más de dos horas, la suspensión mezclada se somete a desaireación, tratamiento a temperatura ultraalta y homogeneización. La suspensión mezclada se calienta a una temperatura de aproximadamente 71 °C a aproximadamente 82 °C y se desairea al vacío. Después, la suspensión caliente se emulsiona a través de un homogeneizador de una sola etapa a de 6,2 a 7,5 MPa. Después de la emulsificación, la suspensión se calienta a de aproximadamente 99° C a aproximadamente 110 °C y después se calienta a una temperatura de aproximadamente 146 °C durante aproximadamente 5 segundos. La suspensión se pasa a través de un refrigerador ultrarrápido para reducir la temperatura a de aproximadamente 99 °C a aproximadamente 110 °C y luego a través de un refrigerador de placas para reducir la temperatura a de aproximadamente 71 °C a aproximadamente 76 °C. La suspensión se homogeneiza después a de 26,8 a 28,2/2,7 a 4,1 MPa. La suspensión se mantiene a aproximadamente 74 °C a aproximadamente 80 °C durante 16 segundos y después se enfría a 1 °C a aproximadamente 7 °C. En este punto, se toman muestras para las pruebas microbiológicas y analíticas. La mezcla se mantiene en agitación.

35 La solución de vitaminas hidrosoluble (WSV) se prepara por separado y se añade a la suspensión mezclada procesada.

40 La solución de vitaminas se prepara mediante la adición de los siguientes ingredientes a 9,4 kg de agua con agitación: premezcla de WSV (distribuida por J.B. Laboratories, Holland, Michigan), vitamina C, cloruro de colina, L-carnitina, taurina, inositol, ácido fólico, piridoxina hidrocloreto y cianocobalamina. Se añade la cantidad requerida de la suspensión de hidróxido de potasio AL 45 % para llevar el pH a entre 7 y 10.

45 Basándose en los resultados analíticos de las pruebas de control de calidad, se añade al lote una cantidad apropiada de agua con agitación para alcanzar el total de sólidos deseado. Además, se añaden a la mezcla diluida 8,8 kg de la solución de vitamina con agitación.

El pH del producto puede ajustarse para conseguir una estabilidad óptima del producto. Después, el producto completado se introduce en recipientes adecuados y se somete a esterilización terminal.

Ejemplo IX

50

Composición de una bebida

55 Para producir un lote de 1000 kg lote de una bebida lista para beber, 987,31 kg de agua se introducen en un recipiente equipado con un agitador. A temperatura ambiente, se añade la cantidad requerida de benzoato de potasio y se deja que se disuelva completamente. Se añade la cantidad requerida de de HMB de calcio y se deja que se disuelva por completo. Después, se añaden los siguientes ingredientes se en el orden indicado. Cada ingrediente se disuelve completamente antes de añadir el siguiente ingrediente.

Tabla 5: Bebida lista para beber

Benzoato de potasio	0,30 kg
HMB de calcio monohidrato	5,7 kg
Citrato de potasio	0,15 kg
Ácido cítrico	2,89 kg
Ácido láctico	1,41 kg
Aspartamo	0,55 kg
Glicerofosfato de calcio	6,06 kg

Agentes colorantes	0,0019 kg
Sabores naturales y artificiales	1,00 kg
Ácido ascórbico	0,33 kg

El ácido ascórbico se añadió justo antes de cargar en latas de aluminio de 340 g. Las bebidas pueden carbonatarse antes de su llenado en latas de aluminio. La solución se desaireada y luego se transfiere a un "carbo-refrigerador", donde se enfría y se carbonata a aproximadamente 2,5 volúmenes de dióxido de carbono.

5

Ejemplo X

Composición de un producto de sustituto de electrolitos

- 10 El siguiente ejemplo explica cómo fabricar una solución de rehidratación lista para beber. Las ORS tenían la composición indicada en la Tabla 6.

TABLA 6: Solución de rehidratación lista para beber

Ingrediente	Cantidad por 454 kg
Agua	437 kg
Dextrosa, monohidrato	10 kg
Fructosa	2,4 kg
Ácido cítrico	1,2 kg
Cloruro de sodio	0,937 kg
Citrato de potasio	1 kg
Citrato sódico	492,0 g
HMB de calcio monohidrato	5,7 kg
Sabor a frutas	226,8 g
Gluconato de cinc	80,62 g
Sucralosa	179,2 g
Acesulfamo potásico	38,1 g
Amarillo n.º 6	7,2 g

- 15 Pesar la cantidad necesaria de agua filtrada y añadirla al tanque de mezcla. Calentar el agua a 43-54 °C, con agitación moderada. Mientras se mantiene con agitación moderada, se añade el HMB de calcio y se deja mezclar durante un mínimo de 5 minutos. Con agitación moderada continua, se añade la cantidad requerida de dextrosa. Agitar hasta que se disuelva. Añadir la cantidad requerida de fructosa. Agitar hasta que se disuelva. Añadir la cantidad requerida de los siguientes ingredientes, en el orden indicado, a la mezcla de dextrosa/fructosa y agitar hasta que se disuelva: gluconato de cinc, citrato de sodio, cloruro de sodio, citrato de potasio, y ácido cítrico. Añadir la cantidad requerida de sucralosa (distribuida por McNeil Speciality Products Company of New Brunswick, Nueva Jersey) y acesulfamo de potasio (distribuido como Sunsett® por Hoechst Food Ingredients of Somerset, Nueva Jersey) y agitar hasta que se disuelva. Añadir al lote el amarillo n.º 6 y el sabor a frutas hasta que se disuelva. Enfriar la mezcla de 1,1–7,2 °C y mantener con agitación baja. Llenar el número requerido de botellas de plástico de un litro, aplicar el sello por calor de lámina de aluminio a la abertura de la botella y someter a retorta hasta conseguir patrones de esterilidad de calidad alimentaria.

- Como alternativa, la mezcla enfriada se encapsula dentro de un material de envasado sellable congelable y se sella, tal como mediante sellado por calor. Una sola dosis de la solución de rehidratación se envasa en una bolsa herméticamente sellada congelable. Varios tipos de materiales de embalaje que se pueden utilizar para practicar la invención, tales como los usados en las paletas de refrigeración tradicionales, serían fácilmente evidentes para el experto en la materia. El material para envolver es, preferentemente, de un tipo que permitirá marcajes, tales como la identificación del producto, ingredientes, etc., para su colocación en la superficie exterior del mismo. La formulación de rehidratación se envía y se almacena, preferentemente en múltiples unidades de la misma, en esta condición. Se contempla el envasado de múltiples unidades o paletas de refrigeración juntas a efectos de su comercialización.

- Antes de la administración, un paquete de la solución de rehidratación líquida se congela. Después de la congelación, el paquete se abre y el contenido del mismo se come. Dado que la formulación de rehidratación congelada normalmente se administrará a temperatura ambiente, la cantidad de líquido de rehidratación contenida en cada envase es, preferentemente, una cantidad que puede consumirse en su totalidad mientras que aún está en estado de congelación. Preferentemente, 567-992 gramos, más preferentemente de 57 a 71 g por paquete. En una realización particularmente preferida, 59 g de la solución de rehidratación estéril se encapsulan dentro de un material para envolver rectangular y congelable, por ejemplo, 1 "8 veces". Se prefiere material para envolver de plástico

transparente.

5 En un aspecto (A), la presente invención se refiere a un compuesto para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de enfermedades en los pacientes mediante regulación por disminución de la expresión y/o la actividad de los componentes seleccionados del grupo que consiste en proteína cinasa C, factor nuclear kappa-B, las enzimas de conjugación con ubiquitina y los componentes del proteasoma 26S, que comprende administrar HMB, sus sales, metabolitos o derivados del mismo.

10 Preferentemente, en el compuesto para su uso en un método de acuerdo con el aspecto (A), la administración de HMB, sus sales, metabolitos o derivados del mismo regulan por disminución la expresión y/o la actividad de la proteína quinasa C.

15 Preferentemente, en el compuesto para su uso en un método de acuerdo con el aspecto (A), la administración de HMB, sus sales, metabolitos o derivados del mismo regulan por disminución la expresión y/o la actividad del factor nuclear kappa-B.

20 Preferentemente, en el compuesto para su uso en un método de acuerdo con el aspecto (A), la administración de HMB, sus sales, metabolitos o derivados del mismo regulan por disminución la expresión y/o la actividad de enzimas de conjugación con ubiquitina.

Preferentemente, en el compuesto para su uso en un método de acuerdo con el aspecto (A), la administración de HMB, sus sales, metabolitos o derivados del mismo regulan por disminución la expresión y/o la actividad de componentes del proteasoma 26S.

25 Preferentemente, en el compuesto para su uso en un método de acuerdo con el aspecto (A), al menos uno de los componentes seleccionados del grupo que consiste en L-carnitina, fuente de nitrógeno amino enriquecido con aminoácidos neutros grandes que carecen sustancialmente aminoácidos libres, ácidos grasos omega-3 y oligosacáridos indigeribles se administra en combinación con el HMB o sales del mismo.

30 Preferentemente, de acuerdo con el aspecto (B), en el compuesto para su uso en un método de acuerdo con el aspecto (A), el estado de enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer, caquexia, pérdida de masa muscular asociada con la edad, pérdida de masa muscular asociada con la hospitalización a largo plazo, VIH/SIDA, artritis, traumatismo, enfermedad hepática, enfermedad de Crohn, EII, insuficiencia renal y EPOC.

35 En un aspecto (C), la presente invención se refiere a una composición que comprende:

- a. HMB, sus sales, metabolitos o derivados del mismo;
- b. carnitina;
- c. fuente de nitrógeno amino enriquecido con aminoácidos neutros grandes; y

40 donde dicha composición carece sustancialmente de aminoácidos libres.

45 Preferentemente, en la composición de acuerdo con el aspecto (C), dicho HMB se selecciona del grupo que consiste en HMB de sodio, HMB de potasio, HMB de magnesio, HMB de cromo, HMB de calcio, HMB de metal alcalino, HMB de e metal alcalinotérreo y lactona HMB. Preferentemente, en un aspecto (D), la composición de acuerdo con el aspecto (C) comprende además ácidos grasos ω -3.

50 Preferentemente, en la composición de acuerdo con el aspecto (D), dichos ácidos grasos ω -3 se seleccionan del grupo que consiste en ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico. Preferentemente, en la composición de acuerdo con el aspecto (C), dichos aminoácidos neutros grandes comprenden al menos 10 % de la fuente de nitrógeno amino.

55 Preferentemente, en la composición de acuerdo con el aspecto (C), dichos aminoácidos libres comprenden menos de 0,4 g/ración de la composición.

Preferentemente, la composición de acuerdo con el aspecto (C) comprende, además, menos de 2 gramos por ración de carnitina.

60 Preferentemente, la composición de acuerdo con el aspecto (C) comprende al menos de 1 gramo por ración de FOS.

Preferentemente, la composición de acuerdo con el aspecto (C) comprende además un nutriente seleccionado del grupo que consiste en vitaminas, minerales, y minerales traza.

65 En un aspecto (E), la presente invención se refiere a una composición que comprende:

- a. de aproximadamente 2 a 10 g/litro de HMB de calcio;
- b. al menos 1 gramo por litro de ácidos grasos ω -3;
- c. de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 g/litro de carnitina;
- d. de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 g/litro de FOS;

- 5 de la fuente de nitrógeno amino enriquecido con aminoácidos neutros grandes, donde dicha fuente de nitrógeno amino comprende de aproximadamente 10 a 60 % en peso/peso de aminoácidos neutros grandes; y donde dicha composición carece sustancialmente de aminoácidos libres.
- 10 Preferentemente, la composición de acuerdo con el aspecto (C) se administra a un ser humano o a un animal.
- Preferentemente, la composición de acuerdo con el aspecto (C) se selecciona del grupo que consiste en suplemento dietético, sustituto de la comida, barras nutricionales, chicles o bocaditos y bebidas.
- 15 En un aspecto (F), la presente invención se refiere a un método de tratamiento de la pérdida de masa muscular asociada a una enfermedad de un paciente, que comprende administrar a dicho paciente la composición de acuerdo con el aspecto (C).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende ácido beta-hidroxi-beta-metilbutírico (HMB) o sus sales para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria crónica o una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, virus de la inmunodeficiencia humana/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH/SIDA), artritis, traumatismo, enfermedad hepática, enfermedad de Crohn, enfermedades inflamatorias intestinales (EII), insuficiencia renal y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en un paciente mediante la regulación por disminución de la expresión y/o la actividad de los componentes seleccionados del grupo que consiste en proteína cinasa C, factor nuclear kappa-B, enzimas de conjugación con ubiquitina y componentes del proteasoma 26S.
- 10 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición regula por disminución la expresión y/o la actividad de la proteína cinasa C.
- 15 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición regula por disminución la expresión y/o la actividad del factor nuclear kappa-B.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición regula por disminución la expresión y/o la actividad de las enzimas de conjugación con ubiquitina.
- 20 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición regula por disminución la expresión y/o la actividad de los componentes del proteasoma 26S.
- 25 6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición carece sustancialmente de aminoácidos libres.

Potenciales acontecimientos intracelulares en el músculo esquelético implicados en la activación del proteasoma inducida por PIF

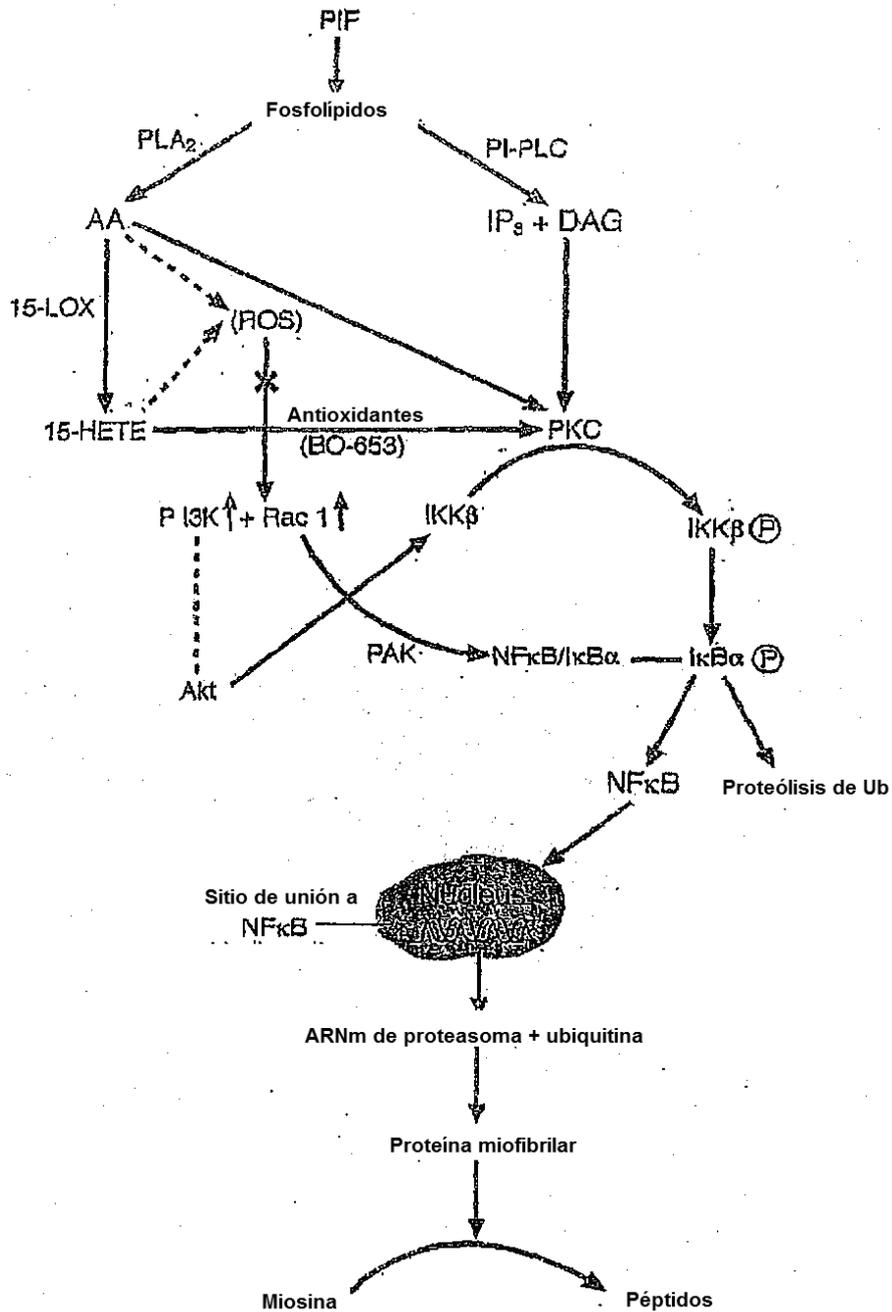


Figura 1

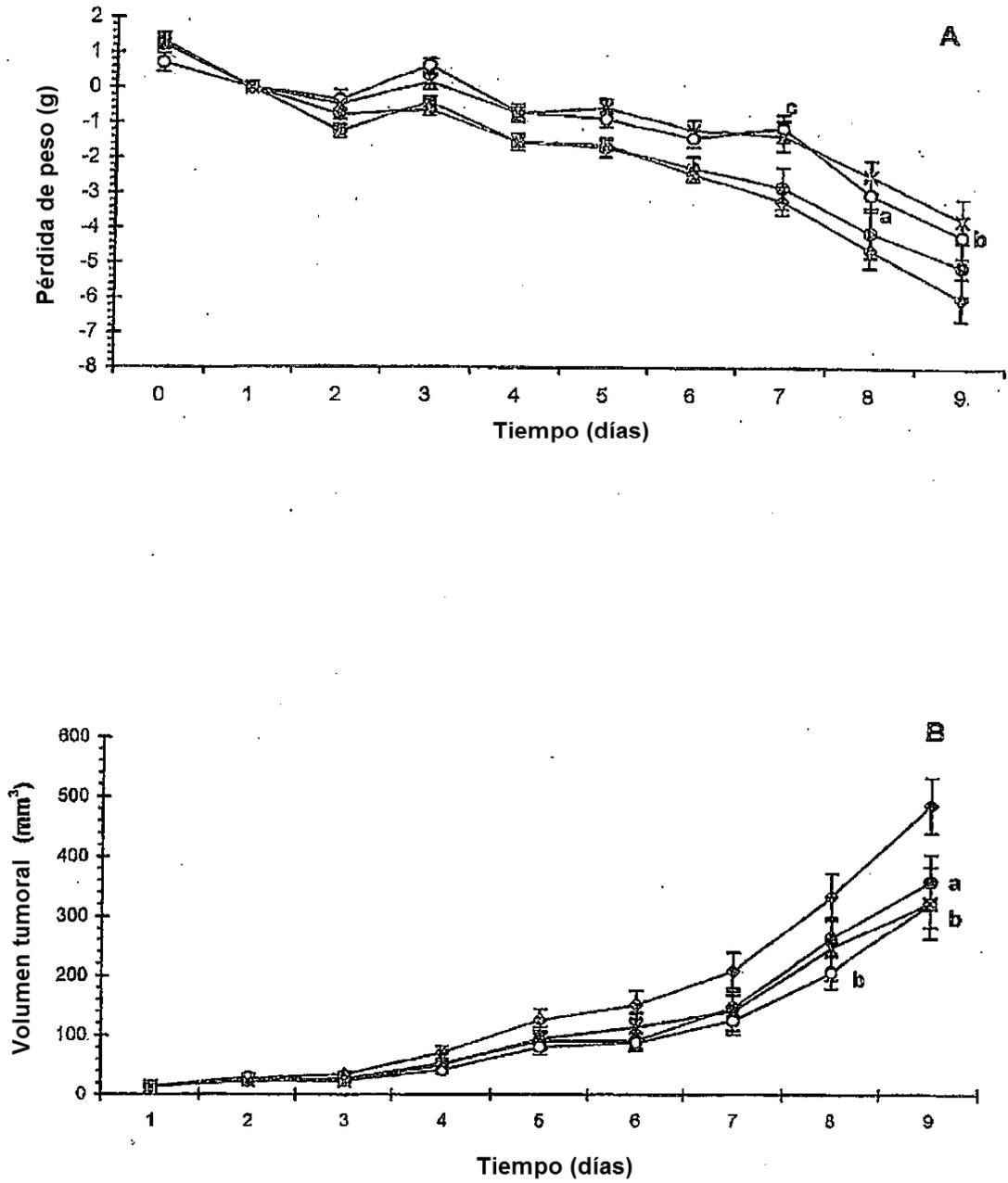


Figura 2

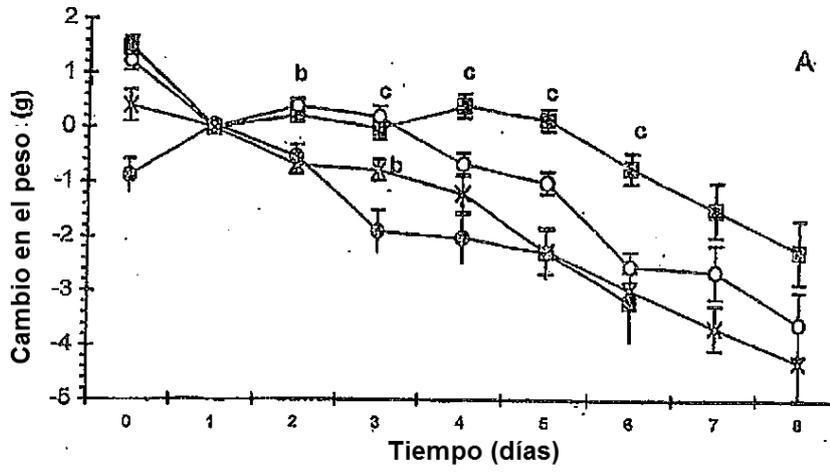


Figura 3

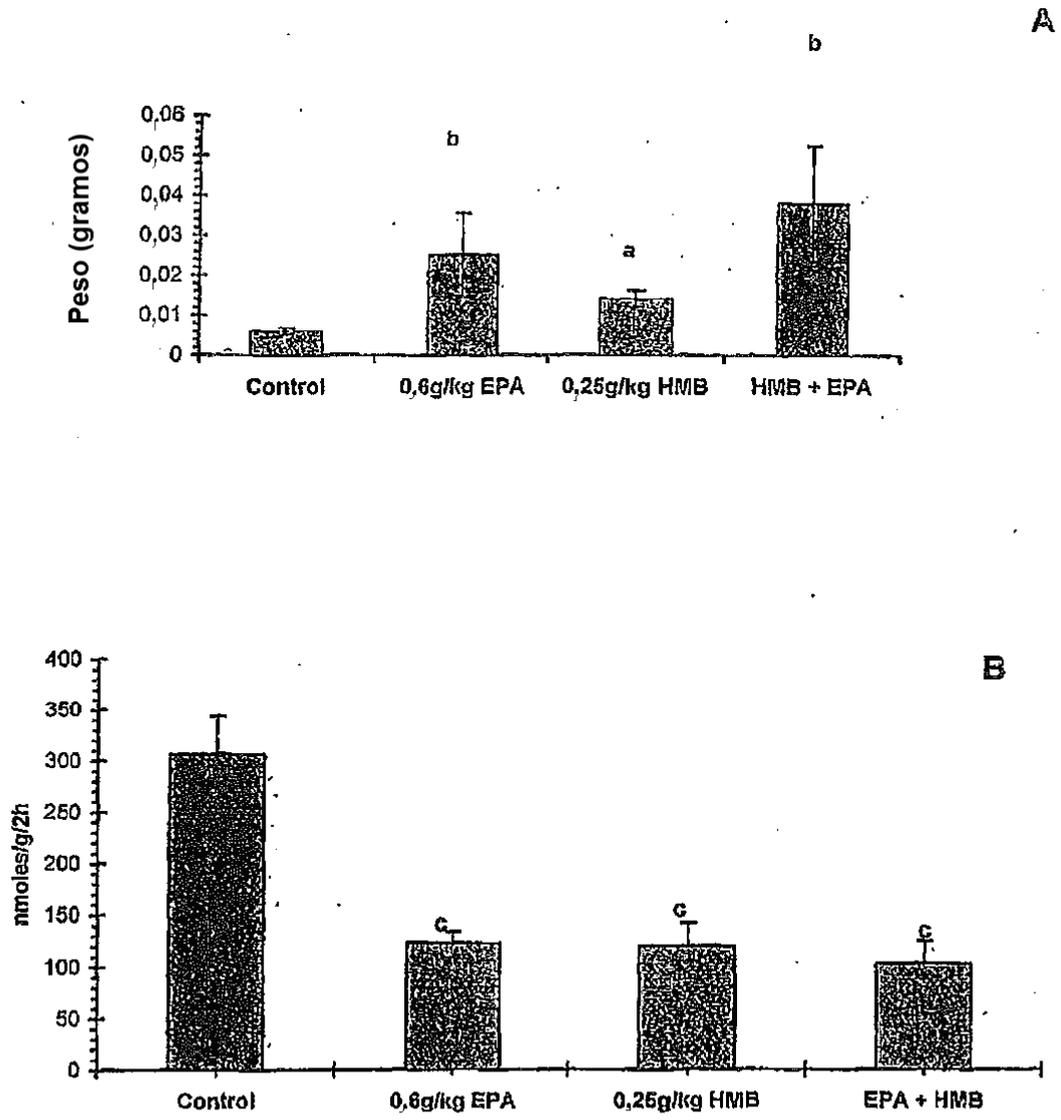


Figura 4

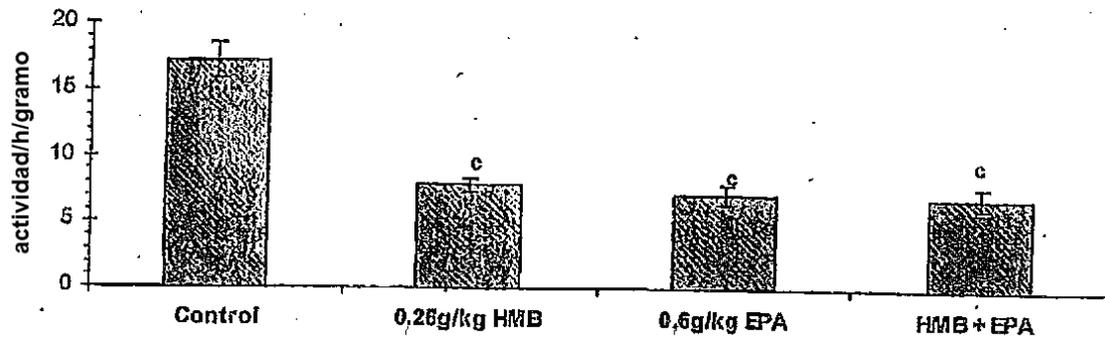


Figura 5

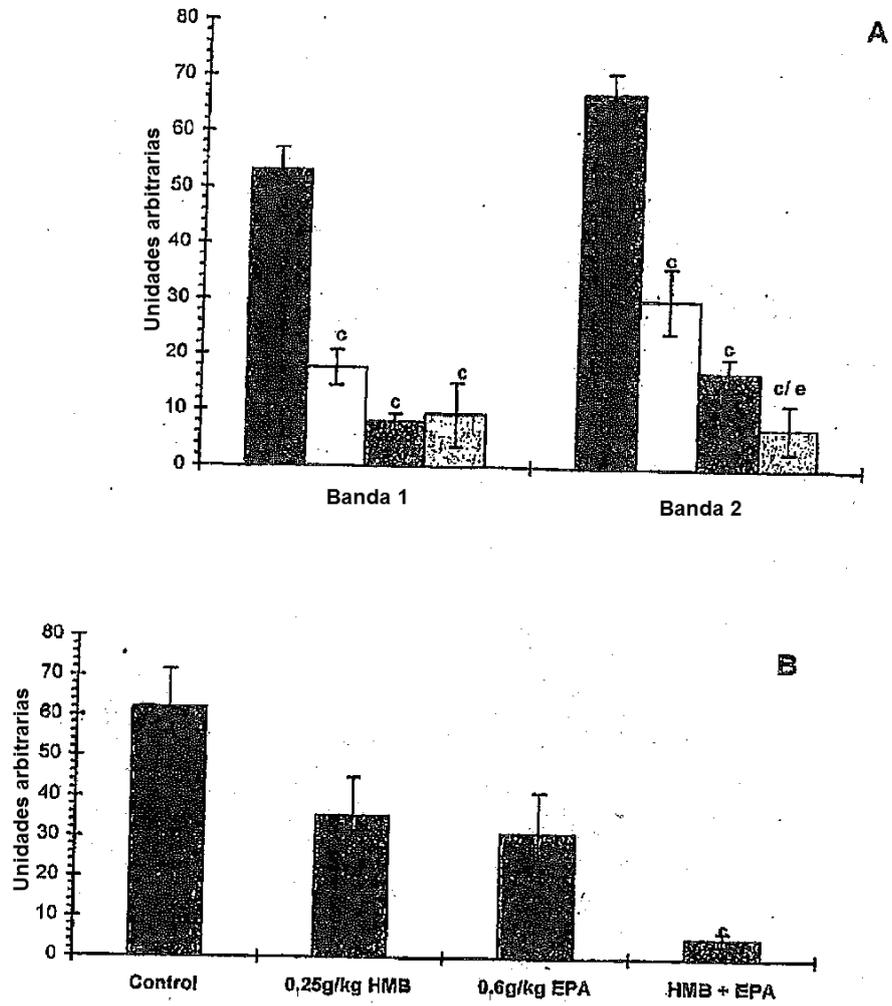


Figura 6

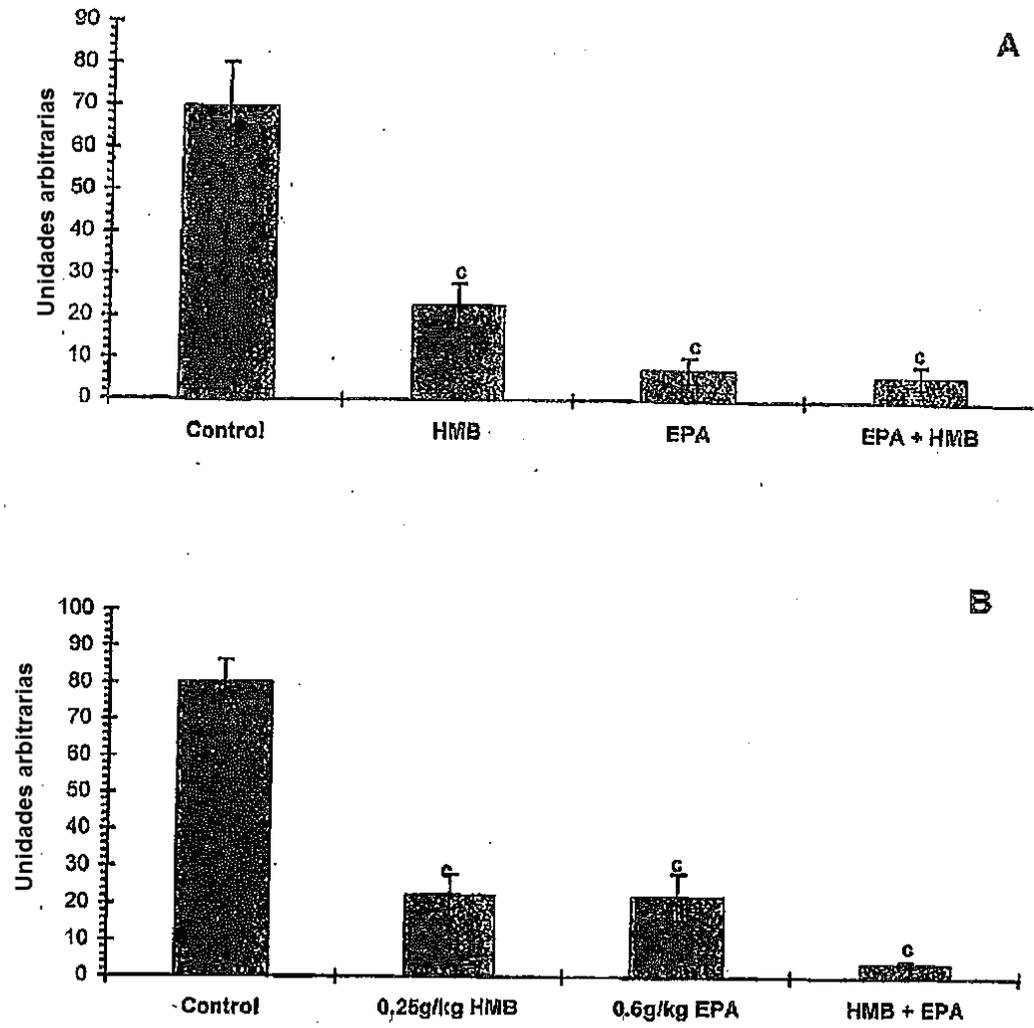


Figura 7

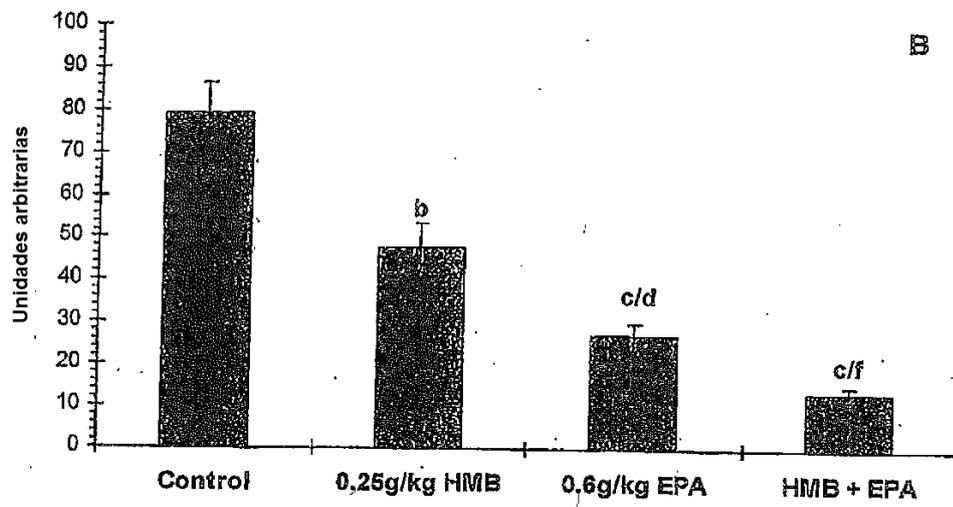


Figura 8

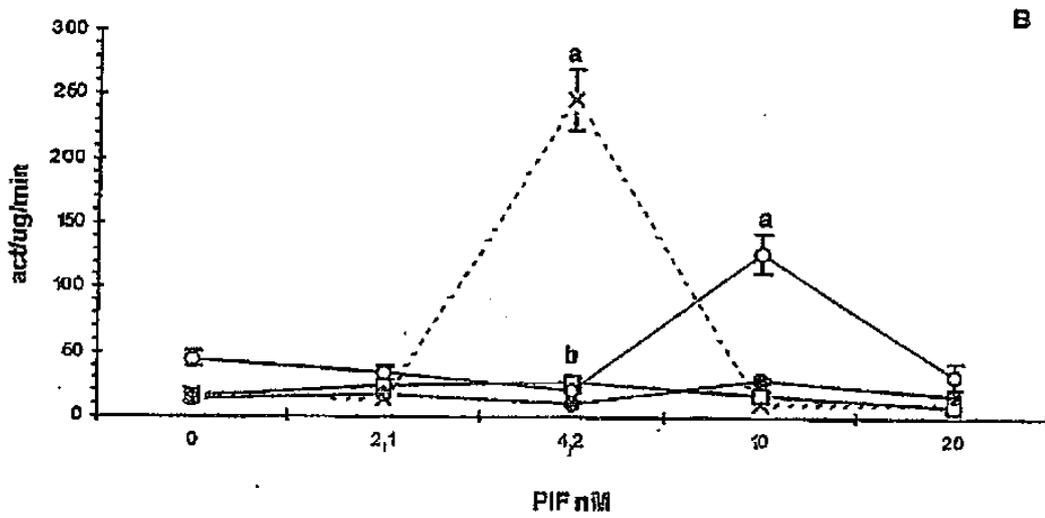
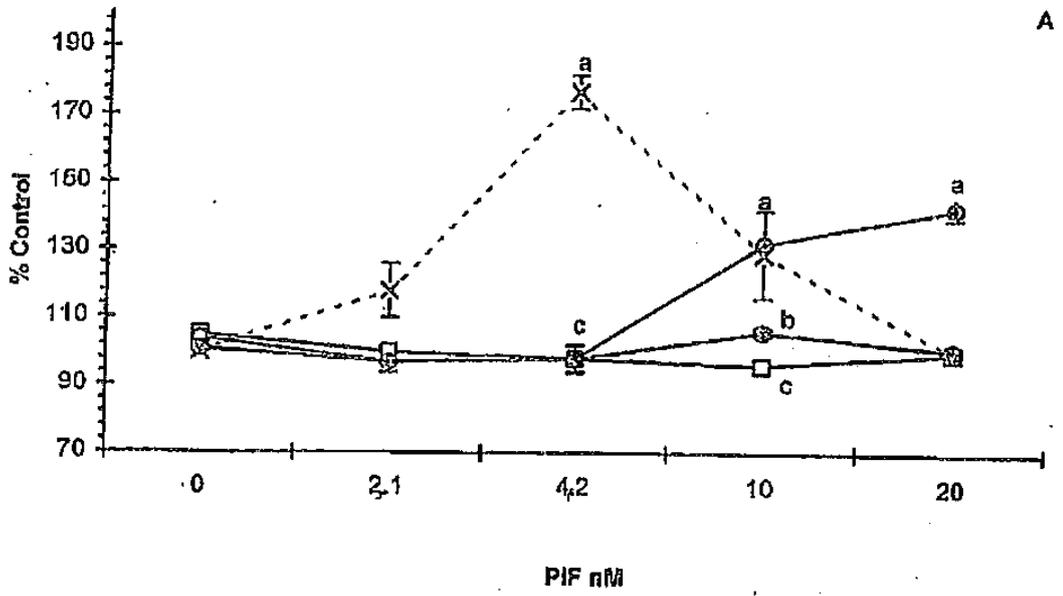


Figura 9

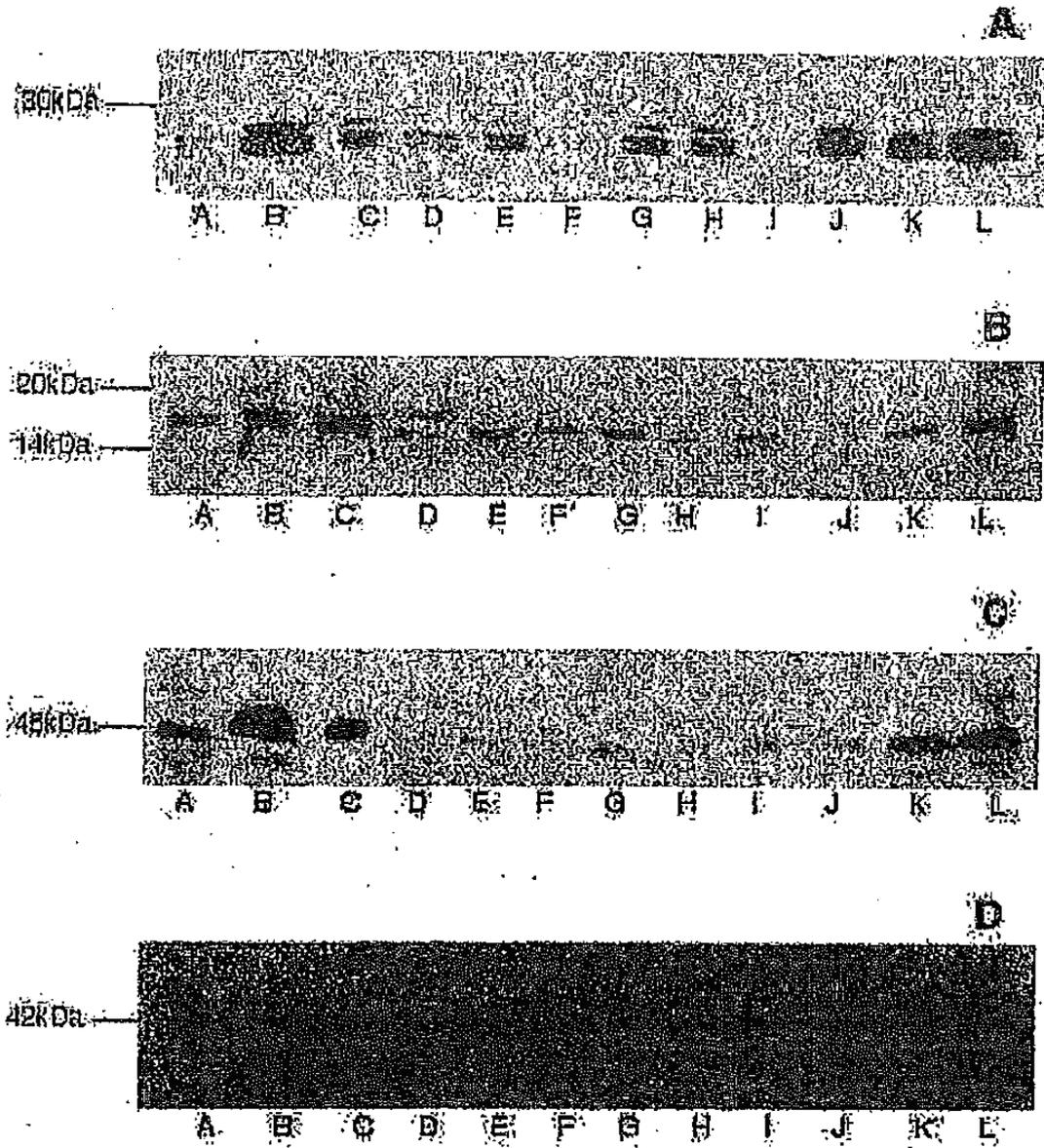


Figura 10

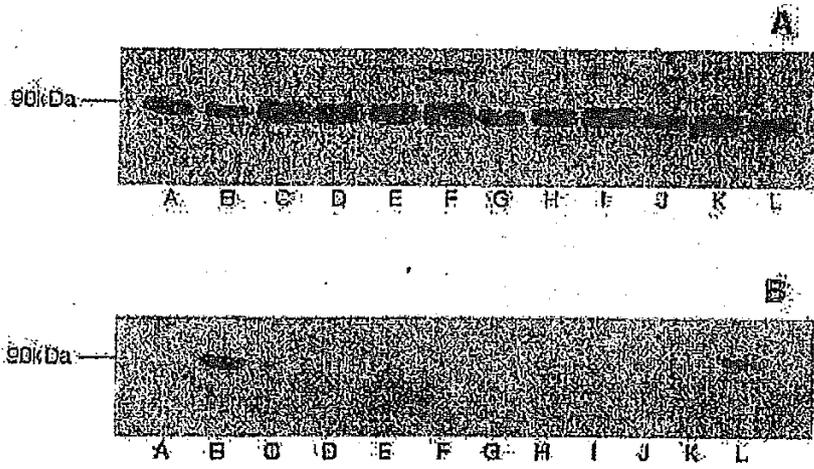


Figura 11

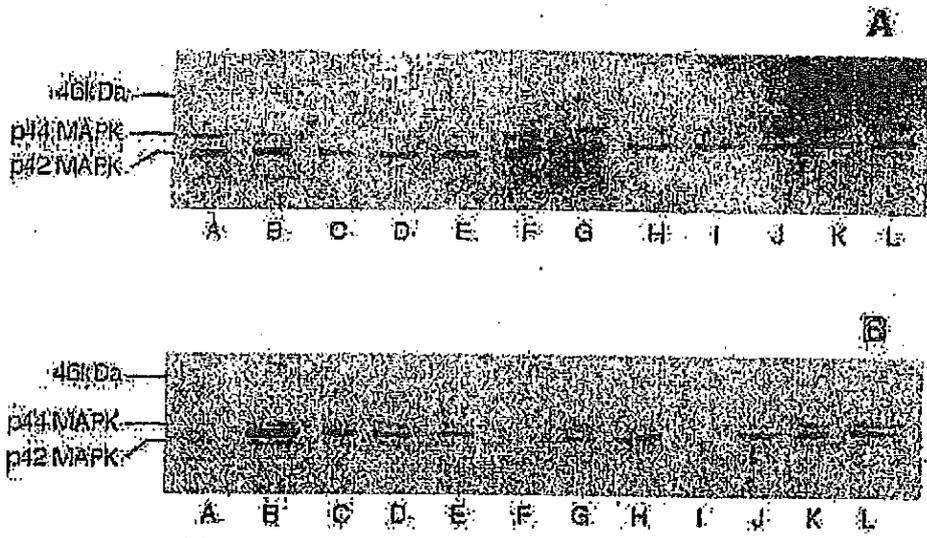
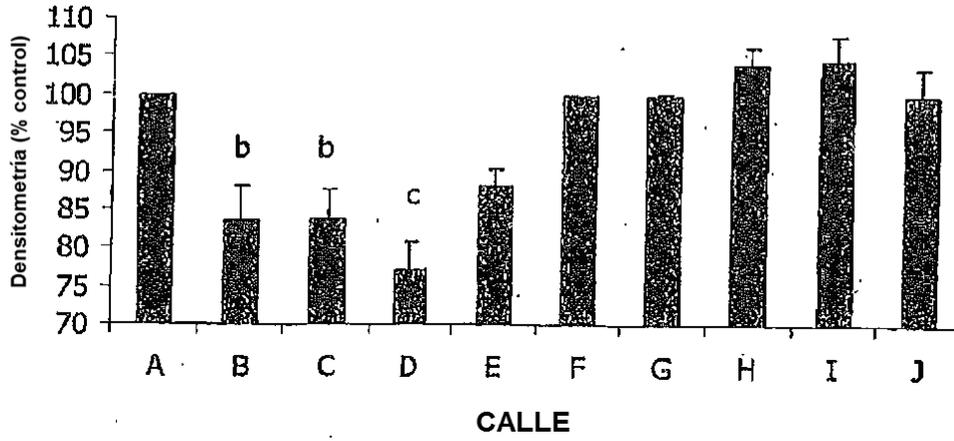


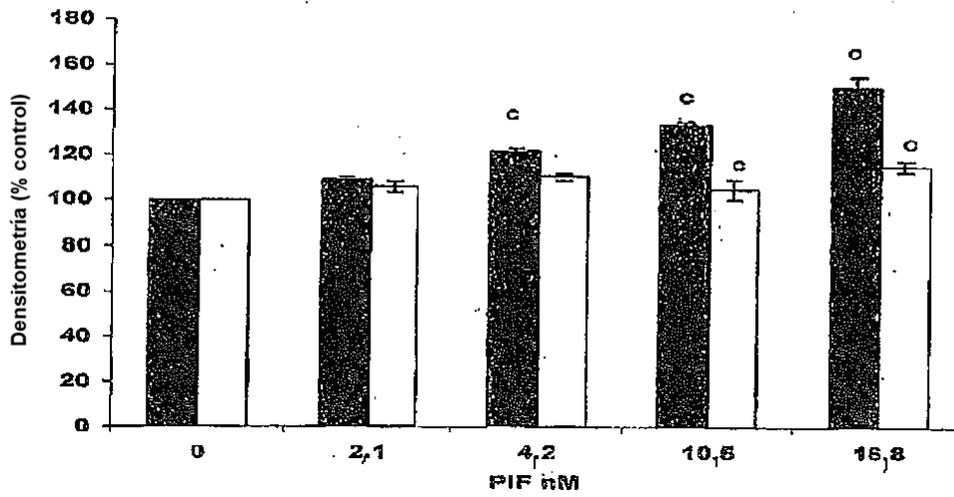
Figura 12

Figura 13

A



B



C

