

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 331**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2010 PCT/US2010/061624**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11084816**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2010 E 10842737 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2533791**

54 Título: **Composición de leucina/péptido y procedimiento de formulación**

30 Prioridad:

21.12.2009 US 288767 P

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

19.07.2017

73 Titular/es:

GLANBIA NUTRITIONALS (IRELAND) LTD.

(100.0%)

Glanbia House

Kilkenny, IE

72 Inventor/es:

PETERSEN, BRENT;

WARD, LOREN y

BASTIAN, ERIC

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 625 331 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de leucina/péptido y procedimiento de formulación

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad con respecto al número de solicitud de patente provisional de EE.UU 61/288,767, depositada el 21 de diciembre de 2009.

Campo de la invención

10

La presente invención se refiere a las composiciones y procedimientos para aumentar la solubilidad de aminoácidos. Más específicamente, la invención se refiere a los procedimientos para la formulación de productos que comprenden aminoácidos en una forma más soluble y composiciones fabricadas mediante dichos procedimientos.

15 **Antecedentes de la invención**

La leucina es un aminoácido de cadena ramificada y un aminoácido esencial. Es el único aminoácido que se convierte en acetilcoenzima A y alfacetoácido, y es una fuente importante de nitrógeno para la síntesis de la glutamina. Además de afectar a la síntesis y degradación de la proteína, la leucina también estimula la asimilación de la glucosa mediante la proteína cinasa C (PKC), mientras que la insulina modula la asimilación de la glucosa a través de la proteína cinasa B.

La pérdida de tejido muscular se produce a menudo como resultado del envejecimiento, malnutrición y enfermedad catabólica, como quemaduras, sepsis y cáncer. Los suplementos dietéticos de proteína pueden ser beneficiosos, pero se ha demostrado que los suplementos con el aminoácido esencial leucina son específicamente beneficiosos. La leucina dietética ha demostrado, por ejemplo, suprimir la tasa de degradación de la proteína miofibrilar y la pérdida de peso muscular en ratas. Además, la leucina estimula la síntesis de proteína muscular y modula la actividad de diversas proteínas involucradas en el control de la traducción del ARNm. La leucina puede estimular la síntesis de proteína directamente o a través de su metabolito, el ácido alfacetoisocaproico. La leucina puede estimular la traducción independientemente o por interacción con la diana de la rapamicina en células de mamíferos (mTOR).

Sin embargo, formular composiciones que comprenden leucina, a menudo se hace más difícil por el hecho de que la leucina, uno de varios de los aminoácidos hidrófobos, no es muy soluble en agua (aproximadamente 0,08 moles/litro). Se han realizado varios intentos para formar composiciones que comprendan leucina en una forma más soluble, incluyendo la formación de péptidos que comprendan leucina en combinación con aminoácidos más hidrófilos que son más solubles, así como la creación de complejos de leucina y restos más solubles como el nitrato para formar nitrato de leucina más soluble (Kramer, R., y col., US20090076110A1). Sin embargo, es bueno proporcionar leucina en su forma de aminoácido libre y por lo tanto sería de gran beneficio desarrollar un procedimiento para formar composiciones que comprendan leucina libre mientras aumenta la solubilidad de la leucina al añadirla a una composición acuosa. Además, dicho procedimiento puede ser también beneficioso para producir más formas solubles de otros aminoácidos

Resumen de la invención

45

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una composición, comprendiendo el procedimiento la mezcla de al menos un aminoácido micronizado con al menos una proteína para producir una mezcla de sólidos que comprende el aminoácido y la proteína, formando una suspensión acuosa que comprende la mezcla de sólidos, y el secado de la suspensión para proporcionar un producto de aminoácidos/proteínas, proporcionando el producto el aminoácido en una forma más soluble que solo el aminoácido libre. Además, la invención se refiere a un procedimiento que comprende micronizar al menos un aminoácido para que se formen productos de aminoácidos donde al menos aproximadamente el 90 % del producto de aminoácidos comprenda tamaños de partícula de menos de aproximadamente 160 micrómetros, mezclando el producto de aminoácidos con al menos una proteína para que el producto de aminoácidos comprenda de aproximadamente el 5 hasta aproximadamente el 90 por ciento de una mezcla de sólidos formada por el producto de aminoácidos y al menos una proteína, mezclando la mezcla de sólidos con agua para formar una suspensión donde la mezcla de sólidos comprenda de aproximadamente el 1 por ciento hasta aproximadamente el 55 por ciento de la suspensión, mezclando la suspensión para formar una suspensión sustancialmente homogénea; agitando la suspensión durante el secado para mantener la suspensión homogénea durante el secado. Algunos aspectos de la invención proporcionan L-leucina como el "al menos un aminoácido", y en otros aspectos el "al menos un aminoácido" puede

ser cualquiera de los aminoácidos, incluyendo, por ejemplo, aminoácidos hidrófobos como los aminoácidos de cadena ramificada. En algunos aspectos el "al menos una proteína" comprende una o más proteínas enteras, uno o más fragmentos de proteínas, y/o uno o más péptidos. En algunos aspectos, el "al menos una proteína" deriva de proteína de suero de leche. En algunos aspectos del procedimiento, la mezcla de sólidos comprende de 5 aproximadamente el 7 por ciento hasta aproximadamente el 55 por ciento de la suspensión. En algunos aspectos, la mezcla de sólidos comprende de aproximadamente el 15 hasta aproximadamente el 20 por ciento de la suspensión.

Además la invención se refiere a las composiciones fabricadas mediante dichos procedimientos, comprendiendo las composiciones aminoácidos en una forma más soluble. Además, los autores de la invención han encontrado que 10 estas composiciones, que tienen baja viscosidad, son más susceptibles al tratamiento térmico con temperaturas más altas sin el indeseado aumento de la viscosidad que resulta en otras composiciones de proteínas que tienen contenidos sólidos similares.

En algunos aspectos, durante la etapa de la mezcla de la suspensión se añade un antiespumante y la mezcla se 15 realiza con cizalla. En algunos aspectos, el producto de aminoácidos se microniza para formar tamaños de partícula de aproximadamente 7 hasta aproximadamente 10 micrómetros.

Breve descripción de los dibujos

20 La fig. 1 ilustra los resultados de mezclar el aminoácido y la proteína en ausencia del procedimiento de la invención. La fotografía superior muestra la mezcla resultante después de mezclarse con agua. La fotografía inferior es una micrografía electrónica de barrido de las partículas de la mezcla. La fig. 2 ilustra los resultados de mezclar el aminoácido y la proteína usando el procedimiento de la invención. La 25 fotografía superior muestra la mezcla resultante después de mezclarse con agua. La fotografía inferior es una micrografía electrónica de barrido de las partículas de la mezcla.

Descripción detallada

Los autores de la invención han descubierto que el coprocesamiento de al menos un aminoácido hidrófobo 30 micronizado, como, por ejemplo, leucina, isoleucina, valina, arginina triptófano o combinaciones de los mismos, con al menos una proteína mezclando al menos un aminoácido con al menos una proteína, suspendiéndolos en suspensión, y después cosecándolos, produce una composición que proporciona el aminoácido y la proteína en una forma más soluble, menos viscosa mientras mantiene aún los beneficios de los aminoácidos libres en la composición. Preferentemente, en la medida de lo posible durante el proceso de secado, la suspensión se mantiene 35 en una suspensión sustancialmente homogénea. Además, es beneficioso para el resultado del procedimiento para que el tamaño de partícula de "al menos un aminoácido" sea menor de aproximadamente 160 micrómetros, y más preferentemente menor de aproximadamente 20 micrómetros. A modo de ejemplo, la leucina puede incorporarse en una composición de la invención con excelentes resultados a un nivel de micronización de aproximadamente 7 hasta aproximadamente 10 micrómetros.

40 Como se usa en el presente documento, el "al menos un aminoácido" es una composición de uno o más aminoácidos proporcionados en general comercialmente en una forma sustancialmente sólida, como un polvo. Sin embargo, dado que el "al menos un aminoácido" se mezclará con al menos una proteína y se suspenderá en una suspensión, se encuentra dentro del alcance de la invención utilizar aminoácidos micronizados en líquido, así como 45 aquellos proporcionados en forma sólida. Estos se conocen generalmente como aminoácidos "libres" por los expertos en la técnica. En varios aspectos, los aminoácidos pueden comprender un aminoácido de cadena ramificada como, por ejemplo, leucina, isoleucina, y/o valina, así como otros aminoácidos, particularmente aquellos aminoácidos. Los aminoácidos hidrófobos, por ejemplo, han sido típicamente difíciles de formular en composiciones líquidas, y esto resulta mucho más fácil preparando composiciones de aminoácidos de acuerdo con el procedimiento 50 de la invención. "Al menos una proteína", como se usa en el presente documento, es una composición de una o más proteínas, fragmentos de proteínas, y/o péptidos en una forma sustancialmente sólida, como, por ejemplo, un polvo. Sin embargo, dado que el "al menos una proteína" se mezclará con al menos un aminoácido y se suspenderá en una suspensión, se encuentra dentro del alcance de la invención utilizar proteína en líquido, así como en forma sólida.

55 En el procedimiento de la invención, al menos un aminoácido que comprende al menos el 90 % de partículas de menos de aproximadamente 160 micrómetros se mezcla con al menos una proteína para que el "al menos un aminoácido" que comprende de aproximadamente el 5 hasta aproximadamente el 90 por ciento de una mezcla de sólidos formada por el aminoácido y la proteína. El "al menos una proteína" puede comprender proteínas y/o 60 péptidos sintetizados, pero puede ser ventajoso y más económico utilizar proteínas aisladas, fragmentos de

proteínas, péptidos aislados, y/o péptidos obtenidos mediante proteínas hidrolizadas. Las proteínas pueden derivar de la leche, como, por ejemplo, proteína de suero de leche, concentrado de proteína de suero de leche, y/o aislado de proteína de suero de leche de vaca, y/o se puede seleccionar de un grupo constituido por soja, huevo, vegetales, pescado, trigo, arroz, maíz, proteínas fúngicas, carne u otras fuentes de proteínas conocidas por los expertos en la técnica, y combinaciones de los mismos. Los concentrados de proteína de suero de leche, por ejemplo, están disponibles comercialmente en una gran variedad de fuentes, como, por ejemplo, Avonlac™ de Glanbia Nutritionals, Monroe, Wisconsin. Los aislados de proteína de suero de leche pueden obtenerse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica o pueden comprarse en fuentes comerciales como, por ejemplo, Glanbia Nutritionals, que produce Provon®. Los concentrados de proteína láctea y aislados de proteína láctea como los productos Solmiko® de Glanbia Nutritionals, así como BarGain® de Glanbia, que es una fuente de proteína de suero de leche y de soja, también proporcionan proteínas que se pueden usar para producir péptidos para la composición y el procedimiento de la invención.

La mezcla de sólidos se mezcla con agua para formar una suspensión donde la mezcla de sólidos comprende de aproximadamente el 1 por ciento hasta aproximadamente el 55 por ciento de la suspensión. Para la L-leucina, por ejemplo, una mezcla de sólidos que comprende aproximadamente el 17 por ciento de la suspensión proporciona resultados excelentes, como lo hace una suspensión que comprende aproximadamente el 55 por ciento de sólidos. Por tanto, en varios aspectos, el intervalo de la mezcla de sólidos puede comprender subintervalos dentro del 1 por ciento hasta el 55 por ciento de intervalos, como de aproximadamente el 7 por ciento hasta aproximadamente el 55 por ciento de la suspensión y de aproximadamente el 15 hasta aproximadamente el 20 por ciento de la suspensión. La suspensión se combina para proporcionar una suspensión sustancialmente homogénea (es decir, tan homogénea como sea posible bajo las condiciones de procesamiento estándar conocidas por los expertos en la técnica). La combinación/mezcla puede llevarse a cabo mediante una variedad de medios, incluyendo entre otros el uso de uno o más homogeneizadores, bombas centrífugas, mezcladores de cizallamiento, microfluidizadores, mezcladores estáticos, tanques agitadores o una combinación de los mismos. Entonces la suspensión se seca, manteniéndose la homogeneidad de la suspensión tanto como sea posible durante el proceso de secado, para producir un producto final que forma un polvo seco.

Para proporcionar una suspensión sustancialmente homogénea, es aconsejable combinar la suspensión con cizalla y añadir un antiespumante. Opcionalmente, después de la combinación, se puede realizar una etapa de pasteurización. Para esta etapa de secado y por medio de un ejemplo no limitante, se pueden usar las siguientes condiciones para lograr un buen rendimiento: Temperatura de entrada 107 °C (225 °F), temperatura de salida 29 °C (85 °F), 3 bares de presión (43,5 psi). El equipo adecuado para el secado puede obtenerse en una variedad de fuentes comerciales y los expertos en la técnica pueden identificar fácilmente dichos equipos. Los expertos en la técnica pueden alterar las condiciones de secado. Los procedimientos para las suspensiones de secado se describen, por ejemplo, en el Manual de secado industrial (Mujumdar, A.S., CRC Press (Taylor and Francis Group), Boca Raton, Florida, 2007). Entre los mezcladores adecuados se incluyen, por ejemplo, mezcladores de lotes de cizallamiento, disponibles comercialmente en una variedad de fuentes como Silverson Machines, Inc., East Longmeadow, Massachusetts. Por ejemplo, se puede usar un mezclador como el mezclador Flashblend® de Silverson, que está adaptado para mezclar polvos con líquido y formar suspensiones homogéneas de los mismos.

La micronización del "al menos un aminoácido" puede realizarse usando, por ejemplo, un micronizador Jet Mill (Sturtevant, Inc., Hanover, Massachusetts). Los micronizadores adecuados están disponibles en una variedad de fuentes comerciales y los expertos en la técnica pueden escogerlos dependiendo de las condiciones particulares y los tamaños de lote deseados.

El procedimiento de la invención es especialmente útil para producir formas más adecuadas de aminoácidos de cadena ramificada como la leucina (L-leucina), isoleucina y valina. Además, cuando sea deseable que al menos una proteína comprenda péptidos que tengan una concentración mayor de leucina, estas pueden obtenerse usando el procedimiento descrito en el número de publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos US20090264363A1 (Ward, L. y col.), que puede usarse para preparar péptidos para su uso en el procedimiento de la presente invención. Por lo tanto, usando dichos péptidos, es posible producir un suplemento de leucina que comprenda una combinación de aminoácido de L-leucina libre y péptidos que contienen leucina que produce una forma más soluble para la administración de L-leucina. Se pueden usar las composiciones realizadas por el procedimiento de la invención, por ejemplo, formulaciones listas para mezclar que comprenden aminoácidos y/o combinaciones de aminoácidos con otros ingredientes, en pastillas, en comprimidos, en barras, en inyecciones, en geles, en bolas de proteínas y/o en productos de panadería.

Sin pretender restringirse a la teoría, los autores de la invención creen que el coprocesamiento del micronizado de al menos un aminoácido con al menos una proteína como se describe por el procedimiento de la invención, crea, o

posiblemente interfiera con, asociaciones intermoleculares no covalentes y altere la solubilidad de la mezcla resultante (y por lo tanto del aminoácido, en comparación con la del aminoácido libre correspondiente), así como produzca un efecto adelgazante y disminuya la viscosidad de la(s) proteína(s) en suspensión. Se ha sugerido que el tratamiento térmico de las proteínas, que puede ser necesario para los procesamientos como la pasteurización, pueden alterar los puentes de disulfuro en las proteínas y aumentar la viscosidad de las proteínas en suspensión. El procesamiento del "al menos un aminoácido" y del "al menos una proteína" como se proporciona por el procedimiento de la invención resulta en un producto que se puede usar para elaborar composiciones líquidas que tengan mayor contenido de sólidos, pero que todavía puedan tratarse térmicamente sin volverse indeseablemente viscosas.

10

Las interacciones con aminoácidos con y sin proteínas se han descrito previamente. Por ejemplo, se ha informado que la composición de aminoácidos de proteínas afecta a la formación del puente de disulfuro, con aminoácidos débilmente hidrófilos y aromáticos siendo más comunes en las áreas cercanas a los puentes de disulfuro, mientras que los residuos alifáticos e hidrófobos son menos comunes Marques, J.F.R. et col., "Patrones del aminoácido alrededor de los puentes de disulfuro", *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11, 4673-4686). La arginina, un aminoácido hidrófobo, debilita las interacciones hidrófobas entre IL-6 y la fenil-sefaroasa, mejorando la elución de la proteína en la cromatografía de interacción hidrófoba Tsumoto, K., et col., "La arginina mejora la elución de la proteína en la cromatografía de interacción hidrófoba: Los casos de interleucina-6 y activina-A" *Journal of Chromatographs A*, 22 de junio de 2007, Vol. 1154 (1-2): 81-86). De acuerdo con Ashokkumar y col., "[e]n la industria láctea, la estabilidad de las proteínas lácteas hacia el tratamiento térmico es un problema de procesamiento importante. La exposición de las proteínas de suero de leche a temperaturas superiores a 70 °C provoca desnaturalización, que a su vez conduce a la agregación de la proteína y a la formación de puentes de disulfuro intermoleculares" ("La sonicación aumenta la estabilidad térmica de proteínas de suero de leche" *J. Dairy Sci.* 92 :5353-5356). Ashokkumar et col. utiliza una combinación de tratamiento térmico y sonicación para alterar estos agregados. Sin embargo, utilizando el procedimiento de la presente invención, se puede reducir la viscosidad de la proteína, incluso con alto contenido de sólidos, con el beneficio añadido de proporcionar uno o más aminoácidos libres en una forma más soluble.

Además, los expertos en la técnica, dada la divulgación en el presente documento, pueden encontrar múltiples usos adicionales para los productos de la invención.

30

La invención puede describirse por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLO

35 Se combinó la L-leucina (136 gramos) con 204 gramos de aislado de proteína de suero de leche (Glanbia Nutritionals, Inc., Twin Falls, Idaho) de acuerdo con el procedimiento previamente descrito. Con el producto resultante se formó una suspensión estable al 10 %, demostrando la solubilidad mejorada de la composición de aminoácidos producida por el procedimiento de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una composición de aminoácidos con mayor solubilidad, comprendiendo el procedimiento la mezcla de al menos un aminoácido micronizado, que comprende al menos 5 aproximadamente el 90 % de las partículas de menos de aproximadamente 160 micrómetros, con al menos una proteína para producir una mezcla de sólidos que comprenden el aminoácido y la proteína, suspendiendo la mezcla de sólidos para formar una suspensión acuosa sustancialmente homogénea, y secar la suspensión para producir un producto de aminoácido/proteína.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1 donde el aminoácido micronizado tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 7 hasta aproximadamente 10 micrómetros.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 donde el aminoácido es un aminoácido hidrófobo.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 1 donde el aminoácido es un aminoácido de cadena ramificada.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la proteína comprende péptidos derivados de proteína de suero de leche.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 1 donde la mezcla de sólidos comprende de aproximadamente el 7 hasta aproximadamente el 55 por ciento de la suspensión.
7. El procedimiento de la reivindicación 1 donde el aminoácido comprende de aproximadamente el 5 hasta aproximadamente el 90 por ciento de la mezcla de sólidos.
- 25 8. Una composición de aminoácidos con solubilidad mejorada de al menos un aminoácido, la composición hecha por un procedimiento que comprende coprocesar una mezcla que comprende al menos un aminoácido micronizado, que comprende al menos aproximadamente el 90 por ciento de partículas de menos de aproximadamente 160 micrómetros, y al menos una proteína para producir una suspensión, y secar la suspensión 30 para dar un producto sustancialmente sólido y/o un péptido/aminoácido en polvo.
9. La composición de aminoácidos de la reivindicación 8 donde el aminoácido micronizado tiene un tamaño de partícula de aproximadamente 7 hasta aproximadamente 10 micrómetros.
- 35 10. La composición de aminoácidos de la reivindicación 8 donde el aminoácido es un aminoácido hidrófobo.
11. La composición de aminoácidos de la reivindicación 8 donde el aminoácido es un aminoácido de cadena ramificada.
- 40 12. La composición de aminoácidos de la reivindicación 8 donde la proteína comprende péptidos derivados de proteína de suero de leche.
13. La composición de aminoácidos de la reivindicación 8 donde la mezcla de sólidos comprende de 45 aproximadamente el 7 hasta aproximadamente el 55 por ciento de la suspensión.
14. La composición de aminoácidos de la reivindicación 8 donde el aminoácido comprende de aproximadamente el 5 hasta aproximadamente el 90 por ciento de la mezcla de sólidos.
- 50 15. Un procedimiento para disminuir la viscosidad de una composición de proteína, comprendiendo el procedimiento la mezcla de al menos un aminoácido que comprende al menos aproximadamente el 90 por ciento de las partículas de menos de aproximadamente 160 micrómetros, con al menos una proteína para producir una mezcla de sólidos que comprenda el aminoácido y la proteína, suspendiendo la mezcla de sólidos en una suspensión acuosa sustancialmente homogénea, y secar la suspensión para producir una composición que sea menos viscosa 55 al reconstituirla en las composiciones acuosas.

Fig. 1

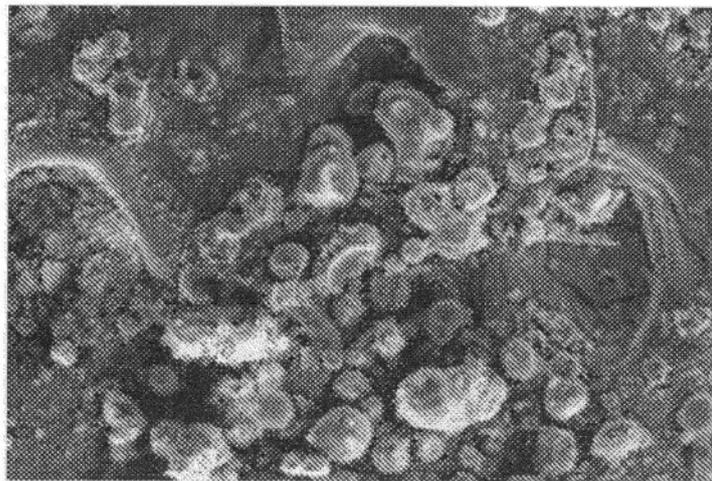


Fig. 2

