

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 161**

51 Int. Cl.:

A61K 31/19	(2006.01) A61P 13/12	(2006.01)
A61K 31/205	(2006.01) A61P 11/00	(2006.01)
A61K 31/202	(2006.01)	
A61K 31/702	(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)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2005** **E 11187274 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018** **EP 2444082**

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:
07.02.2019

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:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 699 161 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 al uso de hidroximetilbutirato o de sus sales para fabricar un medicamento para la prevención o tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria en pacientes. En la práctica de la presente invención, se administra por vía enteral a los pacientes hidroximetilbutirato por sí solo o, alternativamente, en combinación con ácido eicosapentaenoico (20:5 ω -3), fructooligosacáridos, carnitina y mezclas de los mismos. El hidroximetilbutirato puede añadirse a productos alimenticios que comprendan una fuente de nitrógeno amino
- 10 enriquecida con aminoácidos neutros de gran tamaño, como la leucina, la isoleucina, la valina, la tirosina, la treonina y la fenilalanina, y que carezcan sustancialmente de aminoácidos libres.

ANTECEDENTES

- 15 La pérdida de peso no deseada, en particular la pérdida de masa magra, es un hecho relativamente frecuente en las enfermedades graves y tiene un impacto significativo en la morbilidad y la mortalidad. Lo dicho es particularmente cierto en pacientes con cáncer, para los cuales estas pérdidas de masa pueden llegar a limitar el tratamiento y, por consiguiente, a afectar el pronóstico general.
- 20 La caquexia es un síndrome caracterizado por anorexia, pérdida de peso, saciedad prematura, astenia, pérdida de masa corporal magra y disfunción orgánica múltiple. Es una consecuencia común de las enfermedades crónicas (tanto malignas como no malignas) y se asocia a un pronóstico más desfavorable 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
- 25 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)

- La enfermedad pulmonar a menudo se asocia a la caquexia, y un número considerable de pacientes que padecen EPOC, en particular enfisema, se demacran durante la evolución de la enfermedad. La pérdida de peso es un factor
- 30 de riesgo independiente para el pronóstico y a menudo se asocia a un mayor consumo de oxígeno. Esto se ha relacionado con el desarrollo de un metabolismo energético muscular ineficiente (Kutsuzawa, T. y col.: 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 se asocia, asimismo, a una respuesta inflamatoria sistémica general elevada, que se refleja en concentraciones elevadas de citoquinas proinflamatorias y proteínas de fase aguda en la
- 35 sangre periférica (Schols, A. M., y col.: 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., y col.: Circulating leptin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 159:1215-1219, 1999; Dentener, M. A., y col.: Systemic anti-inflammatory mediators in COPD: increase in soluble interleukin I receptor II during treatment of exacerbations. Thorax 56:721-726, 2001.) Este tipo de
- 40 cambios a menudo se asocian a síndromes de desgaste muscular.

- Los estudios con músculos incubados y extractos musculares sugieren que la vía ubiquitina-proteasoma dependiente de ATP es responsable de la mayor parte del aumento de la proteólisis, que en última instancia tiene como resultado el desgaste muscular. En particular, el aumento de los niveles de proteínas conjugadas con
- 45 ubiquitina y el aumento de los niveles de ARNm para la poliubiquitina, ciertas subunidades proteasómicas y la enzima conjugadora de ubiquitina E2_{14K} son características que se encuentran en la mayoría de los músculos atrofiados (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, 2001).

- 50 La mayoría de los pacientes con cáncer cuya enfermedad progresa hasta una enfermedad metastásica desarrollan caquexia durante el programa de tratamiento y la caquexia contribuye a su muerte. La frecuencia de la pérdida de peso en pacientes con cáncer varía desde el 40 % en pacientes con cáncer de mama, leucemia mielocítica aguda y sarcoma hasta más del 80 % en pacientes con carcinoma pancreático y de estómago. Aproximadamente el 60 % de
- 55 los pacientes con carcinomas de pulmón, colon o próstata han experimentado pérdida de peso antes de comenzar la quimioterapia. Aunque se ha establecido una relación entre la desnutrición previa al tratamiento (pérdida de peso) y el resultado adverso, no se ha demostrado una relación uniforme entre el desarrollo de caquexia y el tamaño de los tumores, el estadio de la enfermedad y el tipo o duración de la malignidad.

- 60 La caquexia por cáncer no es simplemente un efecto local del tumor. Frecuentemente se producen alteraciones en

el metabolismo de proteínas, grasas e hidratos de carbono. Por ejemplo, las anomalías en el metabolismo de los carbohidratos incluyen el aumento de la tasa de renovación total de la glucosa, el aumento de la gluconeogénesis hepática, la intolerancia a la glucosa y los niveles elevados de glucosa. Frecuentemente, se observa un aumento de la lipólisis, un aumento de la renovación de los ácidos grasos libres y de la glicerina, hiperlipidemia y una reducción de la actividad de la lipoproteína lipasa. La pérdida de peso asociada a la caquexia por cáncer está motivada no solo por la reducción de los depósitos de grasa corporal, sino también por la reducción de la masa total de proteínas corporales, con un desgaste considerable de los músculos esqueléticos. El aumento de la renovación de proteínas y la oxidación de aminoácidos mal regulada también pueden ser importantes. Se ha propuesto la presencia de factores derivados del huésped producidos en respuesta al cáncer como agentes causantes de caquexia, por ejemplo, el factor de necrosis tumoral- α (TNF) o la caquectina, la interleucina-1 (IL-1), IL-6, el interferón gamma (IFN) y las prostaglandinas (PG) (por ejemplo, PGE₂).

La pérdida de peso es común en pacientes con carcinomas pulmonares y del tracto gastrointestinal, que provocan una pérdida masiva tanto de grasa corporal como de proteína muscular, mientras que la proteína no muscular no se ve afectada. Aunque la pérdida de grasa corporal es importante en cuanto a reservas de energía, la pérdida de proteína muscular esquelética es la que causa la inmovilidad y, finalmente, el deterioro de la función muscular respiratoria, lo que provoca la muerte por neumonía hipostática. Aunque la caquexia suele ir acompañada de anorexia, los suplementos alimenticios por sí solos no pueden mantener un peso corporal estable y los posibles aumentos de peso se deben a un aumento del tejido adiposo y de agua, y no de masa corporal magra. Lo mismo ocurre con los estimulantes del apetito, como el acetato de megestrol y el acetato de medroxiprogesterona, lo que sugiere que la pérdida de masa corporal magra se debe a factores distintos a la insuficiencia energética.

La masa muscular esquelética es un equilibrio entre la tasa de síntesis y la tasa de degradación proteicas. Los pacientes con caquexia por cáncer muestran una depresión de la síntesis de proteínas en el músculo esquelético y un aumento de la degradación proteica, lo que se refleja en una mayor expresión de la vía proteolítica ubiquitina-proteasoma, el principal determinante de la degradación proteica. Así, el músculo esquelético de los pacientes con cáncer caquético muestra una mayor expresión de ARNm tanto de ubiquitina como de subunidades proteasómicas, mientras que la actividad proteolítica proteasómica aumenta en paralelo con la expresión de la ubiquitina. La incapacidad de los estímulos anabólicos de aumentar la masa corporal magra en pacientes caquéticos sugiere que la degradación proteica debe atenuarse para que la masa muscular pueda aumentar. El ácido eicosapentaenoico (EPA) regula negativamente el aumento de la expresión de la vía proteolítica 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 altamente energético que contenía 32 g de proteína y 2 g de ácido eicosapentaenoico, el peso corporal aumentó, lo que se atribuyó únicamente a un aumento de 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).

Un estudio reciente de May y col (May, P.E., Barber, A., D'Olimpio, J.T., Hourihane, 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) demostró que una mezcla de hidroximetilbutirato, arginina y glutamina es efectiva para aumentar el peso corporal en pacientes con cáncer avanzado (en etapa IV). Además, el aumento de peso corporal se atribuyó a un aumento de la masa libre de grasa, como se observó con el ácido eicosapentaenoico.

Se sugiere el uso del ácido graso poliinsaturado eicosapentaenoico 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., la patente de Estados Unidos n.º 5.457.130, publicada el 10 de octubre de 1995; y Tisdale, y col. Cancer Research 50: 5022-5026 (agosto de 1990). No obstante, el producto descrito por Tisdale se administraba en forma de dosificación sólida, por lo que requería que un paciente ya enfermo ingiriese entre 12 y 16 cápsulas al día. Este procedimiento presentaba graves inconvenientes, incluidos la dificultad para tragar, los eructos y el mal olor.

Se ha comprobado que el hidroximetilbutirato es útil en el contexto de diversas aplicaciones. Específicamente, la pat. de Estados Unidos n.º 6.031.000 de Nissen y col. describe una composición que comprende entre aproximadamente 0,5 g y aproximadamente 30 g de hidroximetilbutirato, donde entre aproximadamente 0,5 g y aproximadamente 30 g con base en el peso de la sal de calcio de hidroximetilbutirato y entre aproximadamente 0,5 g y aproximadamente 50 g de L-arginina libre, y entre aproximadamente 0,5 g y aproximadamente 50 g de L-glutamina libre. Además, esta patente proporciona un procedimiento para el tratamiento de la emaciación asociada a una enfermedad en un animal, un procedimiento para la disminución del nivel sérico de triglicéridos en un animal, un procedimiento para la disminución de la carga viral sérica en un animal y un procedimiento para la redistribución de grasa en un animal

que tenga una región visceral y una región subcutánea. Todos los procedimientos consisten en administrar al animal una composición que comprende hidroximetilbutirato y al menos un aminoácido libre.

La pat. de Estados Unidos n.º 5.348.979 de Nissen y col. describe el uso de hidroximetilbutirato en la retención de nitrógeno en sujetos humanos. La cantidad de hidroximetilbutirato administrada es efectiva para la conservación de proteínas de acuerdo con lo determinado por la reducción del nitrógeno urinario. El procedimiento puede utilizarse con pacientes que presenten un balance negativo de nitrógeno debido a la enfermedad y también, con personas mayores normales que presenten pérdida de proteínas. El hidroximetilbutirato puede administrarse por vía oral o por infusión intravenosa. Para ser efectiva, la cantidad de hidroximetilbutirato debe encontrarse dentro de un intervalo comprendido entre 0,01 y 0,20 gramos de hidroximetilbutirato con base en la sal de calcio por kilogramo de peso corporal por 24 horas.

La pat. de Estados Unidos n.º 5.028.440 de Nissen describe un procedimiento para la cría de animales domésticos productores de carne para aumentar el desarrollo de tejido magro. El hidroximetilbutirato o una sal comestible del mismo se administra a los animales en una determinada cantidad durante un período de tiempo suficiente para obtener un aumento sustancial del peso del tejido magro. El procedimiento está especialmente adaptado para su uso con rumiantes, incluido el ganado bovino y ovino destinado a la producción de carne, ya que el hidroximetilbutirato no sufre una destrucción ruminal apreciable. El procedimiento también puede ponerse en práctica con otros animales domésticos, incluidos los pollos y pavos. El hidroximetilbutirato constituye un pienso en el intervalo comprendido entre 0,5 y 100 mg.

La pat. de Estados Unidos n.º 4.992.470 de Nissen describe cómo el uso de hidroximetilbutirato resulta sensiblemente más efectivo para activar la función inmune de los linfocitos T en mamíferos que el alfa-cetoisocaproato (KIC). Para activar los linfocitos T, el hidroximetilbutirato o una sal comestible soluble en agua del mismo se administra al mamífero por una vía, a través de la cual el hidroximetilbutirato entra en la sangre del mamífero. La cantidad administrada es suficiente para mejorar eficazmente la blastogénesis de sus linfocitos T. El procedimiento está adaptado para su uso con mamíferos domésticos, incluido particularmente el ganado vacuno, ovino y porcino. El hidroximetilbutirato también utilizarse como estimulante del sistema inmunológico en humanos. El hidroximetilbutirato (a base de Ca-HMB) se administra por vía oral o parenteral en una cantidad de entre 500 y 2.500 miligramos (mg) por sujeto humano por 24 horas.

La patente alemana DE 29707308 de Kunz describe el uso de aminoácidos de cadena ramificada en combinación con hidroximetilbutirato para fomentar la generación de músculo en la población que practica el entrenamiento con pesas. Kunz señala que un suplemento de 3 gm tomado a diario junto con un consumo de proteínas de 200 gm al día mejora el valor de proteína nutricional y aumenta significativamente la eficiencia proteica. Kunz también describe que pueden lograrse mejores efectos cuando el hidroximetilbutirato se combina con hidrolizados de proteínas y/o mezclas de aminoácidos libres en lugar de con proteínas (puras) intactas.

La patente de Estados Unidos 5.976.50 de Engel y col. describe un suplemento alimenticio para la reducción de peso formado por una mezcla de un dulce a base de azúcar que contiene cantidades terapéuticas de quitosano, kava y un nutracéutico quemador de grasas que puede incluir colina/inusital, picolinato de cromo, hidroximetilbutirato, carnitina y piruvato. El ingrediente nutracéutico mezclado con quitosano y kava funciona para quemar la grasa que haya consumido el cuerpo, es decir, para metabolizar mejor cualquier grasa ingerida que no atraiga el quitosano.

Entre los productos comerciales diseñados para la población que practica el levantamiento de pesas que contienen hidroximetilbutirato se encuentra Lean DynamX de EAS Inc. de Golden, Colorado (Estados Unidos). Lean DynamX proporciona una mezcla de ingredientes que fomentan la pérdida de grasa sin utilizar estimulantes potentes. Los ingredientes incluyen hidroximetilbutirato, 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 toma 2-3 veces al día, una de ellas 30 minutos antes del entrenamiento.

Otros productos comerciales incluyen Mega HMB Fuel® de Twinlab Corporation en Hauppauge, Nueva York (Estados Unidos). Mega HMB Fuel® contiene 750 mg de hidroximetilbutirato en una cápsula. La dosis diaria recomendada es de 4 cápsulas para fomentar la recuperación del daño en las células musculares que puede producirse tras un ejercicio de resistencia intenso.

También son de interés la patente de Estados Unidos 5.444.054 de Garleb, y col. y la patente de Estados Unidos 5.780.451 relacionada. Estos documentos describen composiciones y procedimientos útiles para el tratamiento de la colitis ulcerosa. Dichas composiciones incluyen una fuente de proteína, que pueden ser proteínas intactas o

hidrolizadas de alto valor biológico (col. 21); un oligosacárido indigerible como el fructooligosacárido y una mezcla de lípidos que comprende una proporción relativamente elevada de ácido eicosapentaenoico, lo que contribuye a una proporción relativamente elevada de ácidos grasos ω -3 a ω -6.

- 5 Las vías biológicas de ácidos grasos de cadena larga y las acciones fisiológicas se describen en la patente de Estados Unidos 5.223.285 de DeMichele, y col.

La prevención y/o el tratamiento de la caquexia siguen siendo un problema frustrante. Los estudios, tanto en animales como en humanos, sugieren que el apoyo nutricional resulta, en gran medida, ineficaz para la recuperación de masa corporal magra en el huésped portador de cáncer. Los ensayos aleatorizados que examinan la utilidad de la nutrición parenteral total (NPT) de apoyo como complemento del tratamiento antineoplásico citotóxico han demostrado pocas mejoras en los resultados del tratamiento. Consulte, por ejemplo, Brennan, M.F. y Burt, M.E., 1981, Cancer Treatment Reports 65 (Suppl. 5): 67-68. Esto, junto con una demostración clara 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.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso del ácido beta-hidroxi-beta-metilbútrico (HMB) o sus sales para fabricar un medicamento para la prevención o tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) en pacientes mediante la regulación negativa de la expresión y/o la actividad de componentes seleccionados de entre el grupo que comprende proteína quinasa C, factor nuclear kappa B, enzimas conjugadoras de ubiquitina y componentes del proteasoma 26S. Estos procedimientos incluyen la administración al paciente de hidroximetilbutirato, sus sales, metabolitos o derivados del mismo.

En una realización, el hidroximetilbutirato puede añadirse a productos alimenticios que comprendan una fuente de nitrógeno amino enriquecida con aminoácidos neutros de gran tamaño, como la leucina, la isoleucina, la valina, la tirosina, la treonina y la fenilalanina y que carezcan sustancialmente de aminoácidos libres.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 presenta un esquema que describe los potenciales eventos intracelulares en el músculo esquelético implicado en la activación proteasómica provocada por proteína en grasa.

La figura 2 presenta las curvas de dosis-respuesta del efecto del hidroximetilbutirato sobre el peso corporal (A) y el volumen del tumor (B) en ratones portadores del tumor MAC16. El hidroximetilbutirato (en tampón fosfato salino o PBS) se administró por vía oral en régimen diario a una concentración de 0,05 (●), 0,125 (○) y 0,25 g/kg (X). Los ratones de control recibieron tampón fosfato salino por sí solo (◆). Los resultados mostrados son la media $\pm$ ETM, donde n=20.

La figura 3 presenta el efecto del hidroximetilbutirato (0,25 g/kg; ■), ácido eicosapentaenoico (0,6 g/kg; X) y la combinación (○) junto con los controles con tampón fosfato salino (●) sobre el peso corporal en ratones portadores del tumor MAC16. Los resultados mostrados son la media $\pm$ ETM, donde n=20.

La figura 4 presenta el peso de los músculos sóleo (A) y la tasa de degradación proteica del músculo sóleo (B) en ratones portadores del tumor MAC16 y tratados con ácido eicosapentaenoico (0,6 g/kg), hidroximetilbutirato (0,25 g/kg) o la combinación durante 3 días. Los valores mostrados son la media $\pm$ ETM, donde n=6.

La figura 5 presenta el efecto del hidroximetilbutirato y del ácido eicosapentaenoico sobre la actividad funcional proteasómica, determinada como la actividad enzimática «similar a la quimotripsina», en el músculo gastrocnemio de ratones portadores del tumor MAC16 y tratados durante 3 días. Los resultados se presentan como media $\pm$ ETM, donde n=6.

La figura 6 presenta la expresión de las subunidades α (A) y β (B) del proteasoma 20S, detectadas por Western blot, en el músculo gastrocnemio de ratones tratados durante 3 días con tampón fosfato salino (control), hidroximetilbutirato (0,25 g/kg), ácido eicosapentaenoico (0,6 g/kg) o la combinación. Se muestra el análisis densitométrico de las manchas (n=6). A. control (barras negras), hidroximetilbutirato (barras blancas), ácido eicosapentaenoico (barras sombreadas) y combinación (barras punteadas).

La figura 7 presenta la expresión de las subunidades proteasómicas 19S, MSS1 (A) y p42 (B), detectadas por Western blot, en el músculo gastrocnemio de ratones tratados durante 3 días con tampón fosfato salino (control), hidroximetilbutirato (0,25 g/kg), ácido eicosapentaenoico (0,6 g/kg) o la combinación (hidroximetilbutirato + ácido eicosapentaenoico). Se muestra el análisis densitométrico de las manchas (n=6).

La figura 8 presenta la expresión de E2_{14k}, detectada por Western blot, en el músculo gastrocnemio de ratones tratados durante 3 días con tampón fosfato salino (control), hidroximetilbutirato (0,25 g/kg), ácido eicosapentaenoico (0,6 g/kg) o la combinación (hidroximetilbutirato + ácido eicosapentaenoico). Se muestra el análisis densitométrico

de las manchas (n=6).

La figura 9 (A) presenta el efecto de la proteína en grasa sobre la degradación proteica total en miotubos C₂C₁₂ en ausencia de (X) o presencia de 50 µM de ácido eicosapentaenoico (□) o 25 µM (○) o 50 µM (●) de hidroximetilbutirato. Las mediciones se realizaron 24 horas después de la adición de proteína en grasa y se muestran como media ± ETM, donde n=9. 1(B) presenta la actividad quimiotrófica de extractos solubles de miotubos murinos tratados con proteína en grasa en ausencia o presencia de ácido eicosapentaenoico (50 µM) o hidroximetilbutirato (25 o 50 µM). Los símbolos son los mismos que en (A). Los resultados se presentan como media ± ETM, donde n=9.

La Figura 10 presenta el efecto del ácido eicosapentaenoico y el hidroximetilbutirato en la inducción de proteína en grasa de la subunidad α (A), la subunidad β (B) y la p42 (C) del proteasoma 20S. El control de carga de actina se muestra en (D). Análisis Western blot de extractos solubles de miotubos C₂C₁₂ 24 h después del tratamiento con proteína en grasa por sí sola (carriles A-C) o con proteína en grasa en presencia de 50 µM de ácido eicosapentaenoico (carriles D-F), 50 µM de hidroximetilbutirato (carriles G-I) o 25 µM de hidroximetilbutirato (carriles J-L) a una concentración de proteína en grasa de 4,2 nM (carriles B, E, H y K) o de 10 nM (carriles C, F, I y L). Los cultivos de control recibieron tampón fosfato salino (carril A), 50 µM de ácido eicosapentaenoico (carril D), 50 µM de hidroximetilbutirato (carril G) o 25 µM de hidroximetilbutirato (carril J). Las manchas que se muestran son representativas de tres experimentos distintos.

La figura 11 presenta el análisis Western blot del efecto de la proteína en grasa sobre la proteína quinasa C_α citoplásmica (A) y ligada a la membrana (B) en miotubos murinos. Las células se trataron con proteína en grasa por sí sola (carriles A-C) o con proteína en grasa en presencia de 50 µM de ácido eicosapentaenoico (carriles D-F), 50 µM de hidroximetilbutirato (carriles G-I) o 25 µM de hidroximetilbutirato (carriles J-L) a 4,2 nM (carriles B, E, H y K) o de 10 nM (carriles C, F, I y L). Las células de control recibieron tampón fosfato salino (carril A), 50 µM de ácido eicosapentaenoico (carril D), 50 µM de hidroximetilbutirato (carril G) o 25 µM de hidroximetilbutirato (carril J). Las manchas que se muestran son representativas de tres experimentos distintos.

La figura 12 presenta los análisis de Western blot de ERK 1/2 total (p44 y p42) (A) y de ERK 1/2 activo (fosforilado) (B) en extractos solubles de miotubos murinos tratados con proteína en grasa por sí sola (carriles A-C) o con proteína en grasa en presencia de 50 µM de ácido eicosapentaenoico (carriles D-F), 50 µM de hidroximetilbutirato (carriles G-I) o 25 µM de hidroximetilbutirato (carriles J-L) a una concentración de proteína en grasa de 4,2 nM (carriles B, E, H y K) o 10 nM (carriles C, F, I y L). Las células de control recibieron tampón fosfato salino (carril A), 50 µM de ácido eicosapentaenoico (carril D), 50 µM de hidroximetilbutirato (carril G) o 25 µM de hidroximetilbutirato (carril J). Las manchas que se muestran son representativas de tres experimentos distintos.

La figura 13 presenta el efecto de la exposición de los miotubos C₂C₁₂ durante 30 min a niveles citosólicos de IκB_α (A), determinados por Western blot, y la activación del NF-κB al ADN, determinada por EMSA (B y C). El análisis densitométrico constituye una media de 3 manchas o EMSAs replicados. (A) Los miotubos se trataron con proteína en grasa por sí sola (carriles A-C) o con proteína en grasa en presencia de 50 µM de hidroximetilbutirato a una concentración de 0 (carriles A y F), 2,1 (carriles B y G), 4,2 (carriles C y H), 10,5 (carriles D e I) o 16,8 nM de proteína en grasa (carriles E y J). En (B) y (C), los miotubos se trataron con 0, 2,1, 4,2, 10,5 o 16,8 nM de proteína en grasa en ausencia (barras oscuras) o presencia (barras blancas) de 25 µM de hidroximetilbutirato (B) o de 50 µM de hidroximetilbutirato (C).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El término hidroximetilbutirato, también denominado ácido beta-hidroxi-beta-metilbútrico o ácido beta-hidroxi-isovalérico, puede representarse como (CH₃)₂(OH)CCH₂ COOH en su forma de ácido libre. El HMB es un metabolito de la leucina formado por transaminación a alfa-cetoisocaproato (KIC) en el músculo seguida de oxidación del alfa-cetoisocaproato en el citosol hepático para dar como resultado hidroximetilbutirato.

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

El término «que carece sustancialmente de aminoácidos libres» se refiere a las composiciones que contienen menos de 0,4 gramos de contenido total de aminoácidos libres en una dosis diaria de la composición. Por ejemplo, si el producto está diseñado para administrarse a razón de 1 lata al día, dicha lata de producto contiene una cantidad inferior a un total de 0,4 gramos de aminoácidos libres. Los aminoácidos en cuestión son los que se encuentran naturalmente en los isómeros L, que consisten en uno o más de los siguientes compuestos: L-alanina, L-arginina, L-asparagina, 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 o derivados aceptables desde el punto de vista alimentario o farmacéutico (como los ésteres metílicos

o étlicos).

El término «caquexia» se refiere a un estado general de mala salud y desnutrición. A menudo se asocia a y está provocada por el cáncer maligno, y se caracteriza por la pérdida de apetito, la pérdida de masa corporal, especialmente de masa corporal magra, y el desgaste muscular.

El término «ácidos grasos» se refiere a una familia de ácidos carboxílicos que comprenden una cadena de hidrocarburos, generalmente de entre 12 y 24 carbonos de longitud. Cuando los ácidos son insaturados (comprenden un doble enlace) en al menos un punto de la cadena de hidrocarburos, estos ácidos grasos se designan por la posición del primer enlace doble. Los ácidos grasos ω -3 comprenden un primer enlace doble en el tercer carbono del extremo metilo de la cadena e incluyen, entre otros, el ácido α -linolénico, ácido estearidónico, ácido eicosapentaenoico («EPA»), ácido docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico («DHA») y similares. Los ácidos grasos ω -6 comprenden un primer enlace doble en el sexto carbono del extremo metilo de la cadena e incluyen, entre otros, el ácido linoleico, ácido γ -linolénico, ácido araquidónico («AA») y similares.

Como se usa en el presente documento, el término «productos alimenticios» se refiere a los procedimientos de administración que comprenden una o más grasas, nitrógeno amino e hidratos de carbono, y que proporcionan una parte o la totalidad del apoyo nutricional a un paciente en las cantidades diarias recomendadas. A menudo, un producto alimenticio contiene vitaminas, minerales, oligoelementos y similares para proporcionar una nutrición equilibrada a los sustitutos alimenticios, alimentos médicos y suplementos. Los productos alimenticios pueden presentarse en cualquier forma típica, como bebidas, polvos, barritas, zumos, bebidas carbonatadas o agua embotellada.

El término «ingesta diaria de referencia o IDR» se refiere a un conjunto de referencias dietéticas basadas en el consumo diario recomendado de vitaminas y minerales esenciales. El consumo diario recomendado es un conjunto de consumos estimados de nutrientes establecido por la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, que se actualizan periódicamente para reflejar el conocimiento científico actual.

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

Cualquier referencia a un intervalo numérico utilizada en esta solicitud debe entenderse como modificada por el término «aproximadamente». Además, debe entenderse que cualquier intervalo numérico proporciona apoyo a una reivindicación dirigida a un subconjunto en ese intervalo. Por ejemplo, debe entenderse que la divulgación de un intervalo de 1 a 10 proporciona apoyo, en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a cualquier subconjunto dentro de ese intervalo (es decir, rangos de 2-9, 3-6, 4-5, 2,2-3,6, 2,1-9,9, etc.).

Aunque no se pretende limitar la invención a una teoría de funcionamiento concreta, los solicitantes describen un mecanismo probable a continuación.

En tiempos de extrema necesidad (por ejemplo, hambruna y similares), el cuerpo a menudo utiliza el músculo esquelético como reserva de aminoácidos y energía. En este proceso media la regulación positiva de la proteólisis y la regulación negativa de la síntesis proteica en el músculo. El resultado neto de lo anterior es la liberación de aminoácidos procedentes de los músculos en la circulación general, que se utilizan para el mantenimiento de sistemas críticos. Cuando se restablecen la buena salud y la disponibilidad de nutrientes adecuados, el músculo se reconstruye. En el caso de la caquexia, este sistema se activa de forma inapropiada, por lo que, incluso existiendo una suficiencia nutricional, continúa la degradación de las proteínas del tejido muscular.

Uno de los sistemas proteolíticos clave que se activan de forma inapropiada es el sistema ubiquitino-proteasómico. Cuando funciona normalmente, este sistema detecta las proteínas envejecidas o de otro modo dañadas o que ya no son necesarias y las marca para eliminarlas mediante la conjugación con ubiquitina. El proteasoma detecta estas proteínas ubiquitinadas y las degrada, liberando ubiquitina y péptidos libres y aminoácidos libres en un proceso que consume energía. Existe una serie de moléculas de señalización que activan o regulan positivamente este sistema, incluido el factor inductor de proteólisis (FIP), un factor proteico producido por ciertos tumores que provocan caquexia. La unión del PEG a la célula muscular causa la regulación positiva de la fosfolipasa A (PLA). Esto, a su vez, produce factores de señalización que, en última instancia, activan la proteína quinasa C, provocando la activación de genes (mediante el factor nuclear kappa B, NFkB) para la conjugación de ubiquitina y para ciertas subunidades del proteasoma. El resultado neto de toda esta señalización es la regulación positiva del sistema ubiquitino-proteasómico y la degradación inadecuada y continuada de proteínas en el músculo. La figura 1 muestra una vía detallada de esta secuencia de activación.

Proteína quinasa C

La proteína quinasa C es una familia de quinasas serina-treonina-treonina activadas por calcio y lípidos que juegan un papel clave en numerosas cascadas de señalización intracelular. Existen al menos 12 isotipos de proteína quinasa C diferentes, que se agrupan en tres clases de acuerdo con 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). Se trata de los convencionales - (cPKC α , β I, β II y γ), que requieren diacilglicerol, fosfatidilserina y calcio para su activación, los novedosos (nPKC δ , ϵ , η , θ y μ), que requieren diacilglicerol y fosfatidilserina, pero son independientes del calcio, y los atípicos (aPKC λ , τ y ζ), que son independientes del calcio y el diacilglicerol.

La PKC se sintetiza como una proenzima ligada a una membrana. La eliminación de la prosequencia por clivaje proteolítico y la subsiguiente fosforilación libera una enzima competente de la membrana al citosol. La interacción posterior con los conjuntos concretos de activadores produce enzimas activas. Así, existen varios niveles de regulación posibles, incluidos el control de la expresión, el control del procesamiento proteolítico, el control de los eventos iniciales de fosforilación y, por último, la regulación de los niveles citosólicos de los diversos activadores necesarios para la plena actividad.

La proteína quinasa C está involucrada en algunas de las vías de señalización que conducen a la mitogénesis y la proliferación celular, la apoptosis, la activación plaquetaria, 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 receptor principal de los ésteres forbólicos promotores de tumores proporcionó un reactivo clave para el estudio del mecanismo de acción de esta enzima. La PKC regula las vías relevantes para la inflamación y los estados cardiovasculares, microvasculares periféricos, del SNC, de oncología, inmunológicos y de enfermedades infecciosas, que se consideran objetivos serios e importantes para el desarrollo de fármacos (P. G. Goekjian and 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 Gravitt 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*, pages 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)).

35 NFkB

El factor nuclear κ B (NFkB) es una familia de factores de transcripción que se encuentran en una amplia variedad de células de mamíferos. La molécula madura es un homo- o heterodímero compuesto de uno o dos de los siguientes 5 productos génicos (RelA (p65), p50, RelB, c-Rel y p52). El más común es un dímero de RelA y p50. En condiciones no activadas, el NFkB se localiza en el citosol por asociación con una proteína inhibidora Ikb α . La señalización en flujo ascendente incluye una Ikb quinasa, y la fosforilación de la Ikb α ligada provoca su liberación del NFkB, permitiendo la translocación de esta última al núcleo y la activación de la transcripción de genes específicos. La vía ubiquitina-proteasoma degrada la Ikb α fosforilada.

El NFkB suele considerarse como una molécula reguladora clave asociada a la inflamación. Por lo tanto, desempeña un papel clave tanto en las enfermedades inflamatorias agudas como crónicas (AB Lentsch y PA Ward: "Activation and regulation of NFkB during acute inflammation." *Clin Chem Lab Med* 37(3):205-208 (1999)). También desempeña un papel en ciertos aspectos de otras enfermedades, 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: "NFkB: A pivotal transcription factor in prostate cancer metastasis to bone." *Clinical Orthopaedics and Related Research* 415S:S75-S85 (2003)). Este factor de transcripción está involucrado en el desarrollo del síndrome diabético (E. Ho y TM Bray: "Antioxidants, NFkB activation and diabetogenesis." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 222:205-213 (1999)) y en el desarrollo y la regulación inmunológicos (J Moscat, MT Diaz-Meco y P Rennert: "NFkB activation by proptein kinase C isoforms and B-cell function." *EMBO Reports* 4:31-36 (2003)). Por último, el NFkB se asocia al control de la apoptosis y al crecimiento y la diferenciación. De hecho, se cree que el PEG (factor inductor de proteólisis, que es liberado por los tumores y está involucrado en la pérdida de masa magra provocada por el cáncer) es un regulador del desarrollo embrionario y que desencadena una cascada de señalización, en última instancia a través del NFkB (F. Delfino y WH Walker: "Hormonal regulation of the NFkB 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 NFkB 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 resultante de la activación de la PLA, en particular, la liberación de ácido araquidónico (AA). Esto impide la posterior regulación positiva y activación de la vía ubiquitina-proteasoma al eliminar el evento de señalización inicial. El HMB, aunque no impide la activación de PLA ni la liberación de AA, sí impide la regulación positiva de la proteína quinasa C, impidiendo toda activación posterior en la vía de señalización e impidiendo también, en última instancia, la activación del sistema ubiquitino-proteasómico.

10 Ahora, se ha descubierto, sorprendente e inesperadamente, que el HMB por sí solo puede reducir la tasa de crecimiento tumoral y, en combinación con dosis subóptimas de EPA, mejorar el efecto antitumoral. La combinación de EPA y HMB preserva la masa muscular al atenuar la degradación proteica mediante la regulación negativa del aumento de la expresión de los componentes reguladores clave de la vía proteolítica ubiquitina-proteasoma.

15 El término «HMB» se refiere al compuesto que comprende la fórmula química anterior, tanto en su forma de ácido libre como en su forma de sal, así como a los metabolitos y derivados del mismo. Aunque puede utilizarse cualquier forma adecuada de HMB en el contexto de la presente invención, preferentemente, el HMB se selecciona de entre el grupo que comprende un ácido libre, una sal, un éster, y una lactona; más preferentemente, el HMB es una sal.

20 Aunque puede utilizarse cualquier sal farmacéuticamente adecuada de HMB en el contexto de la presente invención, preferiblemente, la sal de HMB es soluble en agua o se vuelve soluble en agua en el estómago o los intestinos de un paciente. Más preferiblemente, la sal de HMB se selecciona de entre el grupo que comprende una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de magnesio, una sal de cromo y una sal de calcio. Más preferiblemente, la sal de HMB es una sal de calcio. No obstante, pueden utilizarse otras sales no tóxicas, como otras sales metálicas alcalinas o sales metálicas de tierra alcalina.

Del mismo modo, puede utilizarse 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. 30 Preferiblemente, el éster de HMB es un éster metílico o éster etílico. El éster metílico de HMB y el éster etílico de HMB se convierten rápidamente a la forma de ácido libre de HMB.

Del mismo modo, puede utilizarse 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. 35 Preferiblemente, la lactona de HMB es una lactona isovaleril o una lactona similar. Este tipo de lactonas se convierten rápidamente en la forma de ácido libre de HMB.

Los procedimientos de fabricación de HMB y sus derivados se conocen en la técnica. Por ejemplo, el HMB puede sintetizarse por oxidación de alcohol de diacetona. Un procedimiento adecuado se describe en Coffman y col., J. Am. Chem. Soc. 80: 2882-2887 (1958)). Como se describe en este documento, el HMB se sintetiza mediante la oxidación de un hipoclorito de sodio alcalino del alcohol de diacetona. El producto se recupera en forma de ácido libre, que puede convertirse en la sal deseada. Por ejemplo, el ácido 3-hidroxi-3-metilbutírico (HMBA) puede sintetizarse a partir de alcohol de diacetona (4-hidroxi-4-metilpentano-2-ona) por oxidación utilizando hipoclorito acuoso frío (lejía). Después de acidificar la mezcla de reacción con HCl, el producto HMBA se recupera mediante 45 extracción con acetato de etilo, y se separa y retiene la capa orgánica de la mezcla de extracción. El acetato de etilo se elimina por evaporación y el residuo se disuelve en etanol. Después de agregar $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y enfriar la fórmula, el CaHMB cristalino puede recuperarse por filtración y los cristales pueden lavarse con etanol y después, secarse. Alternativamente, la empresa TSI de Salt Lake City, Utah (Estados Unidos) comercializa la sal de calcio de HMB.

50 El apoyo nutricional en pacientes con cáncer puede categorizarse en (i) de apoyo, donde se establece un apoyo nutricional para prevenir el deterioro nutricional en el paciente adecuadamente nutrido o para rehabilitar al paciente agotado antes de la terapia definitiva; (ii) complementario, donde el apoyo nutricional desempeña un papel integral en el plan terapéutico; y (iii) definitivo, donde se requiere un apoyo nutricional agresivo para la existencia del paciente. Las vías por las que se proporciona el apoyo nutricional incluyen la dieta oral, la alimentación por sonda y la nutrición parenteral periférica o total. La realización preferida de los procedimientos y composiciones nutricionales descritos en el presente documento se efectuará por vía oral.

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

60

Los efectos beneficiosos del HMB sobre la masa corporal magra de un paciente pueden lograrse de varias maneras. Si se desea, el HMB puede administrarse por sí solo, sin vehículo. Simplemente, el HMB puede disolverse en agua y ser consumido por el paciente. Alternativamente, el HMB puede espolvorearse sobre los alimentos, disolverse en el café, etc. La dosis total diaria para el paciente variará notablemente, pero por lo general, un paciente se beneficiará de consumir al menos 2 gm/día de HMB. Alternativamente, entre 20 y 40 mg/kg/día.

En otra realización, el HMB puede incorporarse en píldoras, cápsulas, comprimidos de disolución rápida, pastillas, etc. La dosis activa puede variar notablemente, pero por lo general, oscila entre 250 mg y 1 gm/dosis, y el paciente consumirá entre 2 y 8 dosis/día para alcanzar el objetivo de 2 gm/día como mínimo. Los procedimientos de preparación de estas formas de dosificación se conocen en la técnica. Nos gustaría dirigir la atención del lector a la edición más reciente de Remingtons Pharmaceutical Sciences, que contiene orientación sobre cómo preparar dichas formas de dosificación.

Aunque el HMB puede administrarse como una sola entidad, típicamente se incorporará a los productos alimenticios y para que el paciente lo consuma durante las comidas o junto con un tentempié. Si se desea, el paciente puede simplemente modificar la receta de algún alimento que consuma habitualmente espolvoreándolo sobre los alimentos, disolviéndolos en el café, etc.

En otra realización, el HMB se incorporará a bebidas, barritas, galletas, etc. que hayan sido específicamente diseñadas para mejorar la palatabilidad del HMB y ampliar el abanico de formas alternativas, mejorando la aceptación del paciente/consumidor.

Típicamente, el HMB se incorporará a bebidas sustitutivas de alimentos como Ensure®, Boost®, Glucerna®, Pediasure®, Pedialyte®, etc. Asimismo, el HMB puede incorporarse a barritas sustitutivas de alimentos como PowerBars®, Glucerna®, barritas Choice DM®, barritas Ensure® y barritas Boost®, etc. Alternativamente, el HMB puede incorporarse a zumos, bebidas carbonatadas, agua embotellada, etc. Además, el HMB puede incorporarse a alimentos médicos como ProSure®, Promote®, Jevity® y Advera®, diseñados para ofrecer apoyo durante estados patológicos concretos como el cáncer, el VIH/SIDA, la artritis, la EPOC, etc. Los procedimientos de fabricación de cualquiera de estos productos alimenticios son conocidos por los expertos en la materia. El siguiente análisis tiene por objeto ilustrar dichos productos alimenticios y su preparación.

La mayoría de los sustitutos alimenticios (es decir, barritas o líquidos) proporcionan calorías provenientes de grasa, hidratos de carbono y proteínas. Estos productos suelen contener, además, vitaminas y minerales, ya que su finalidad es ser aptos como única fuente de nutrición. Aunque dichos sustitutos alimenticios pueden servir como la única fuente de nutrición, generalmente no lo son. Los individuos consumen estos productos para sustituir una o dos comidas al día, o como un tentempié saludable. Debe interpretarse que los productos alimenticios descritos en el presente documento incluyen cualquiera de estas realizaciones.

La cantidad de estos ingredientes nutricionales puede variar notablemente dependiendo de la población de pacientes objetivo (es decir, cáncer, VIH/SIDA, artritis, consideraciones organolépticas, preferencias culturales, uso, etc.). No obstante, como pauta general no limitante, los sustitutos alimenticios descritos en el presente documento contendrán las siguientes cantidades relativas de proteínas, grasas e hidratos de carbono (en función del porcentaje relativo de las calorías totales): un componente proteínico que aporta entre el 5 y el 80 % del contenido calórico total, un componente de hidratos de carbono que aporta entre el 10 y el 70 % del contenido calórico total y un componente lipídico que aporta entre el 5 y el 50 % del contenido calórico total.

Los sustitutos alimenticios contendrán los hidratos de carbono, lípidos y proteínas adecuados conocidos por los expertos en elaboración de fórmulas nutricionales. Los hidratos de carbono adecuados incluyen, entre otros, almidones hidrolizados, intactos, naturales y/o químicamente modificados provenientes de maíz, tapioca, arroz o patata en formas cerosas o no cerosas y azúcares como glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, jarabe de maíz con alto contenido de fructosa, sólidos de jarabe de maíz, fructooligosacáridos y mezclas de los mismos.

Los lípidos adecuados incluyen, entre otros, el aceite de coco, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de cártamo de alto contenido oleico, aceite TCM (triglicéridos de cadena media), aceite de girasol y aceite de girasol de alto contenido oleico, aceite de palma, oleína de palma, aceite de canola, aceite de semilla de algodón, aceite de pescado, aceite de palmiste, aceite de menhaden, aceite de soja, lecitina, fuentes lipídicas de ácido araquidónico y ácido docosahexanoico y mezclas de los mismos. Las fuentes lipídicas de ácido araquidónico y ácido docosahexanoico incluyen, entre otros, aceite marino, aceite de yema de huevo y aceite procedente de hongos o de algas.

Numerosas fuentes comerciales de estas grasas están fácilmente disponibles y son conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los aceites de soja y de canola están disponibles en Archer Daniels Midland en Decatur, Illinois (Estados Unidos). Los aceites de maíz, coco, palma y palmiste están disponibles en Premier Edible Oils Corporation en Portland, Oregón (Estados Unidos). El aceite de coco fraccionado está disponible en Henkel Corporation de LaGrange, Illinois (Estados Unidos). Los aceites de cártamo alto oleico y de girasol alto oleico están disponibles en SVO Specialty Products en Eastlake, Ohio (Estados Unidos). El aceite marino está disponible en Mochida International en Tokio (Japón). El aceite de oliva está disponible en Anglia Oils en North Humberside (Reino Unido). Los aceites de girasol y de semilla de algodón están disponibles en Cargil en Minneapolis, Minnesota (Estados Unidos). El aceite de cártamo está disponible en California Oils Corporation en Richmond, California (Estados Unidos).

Además de estos aceites de calidad alimentaria, pueden incorporarse lípidos estructurados al producto alimenticio si se desea. Los lípidos estructurados se conocen en la técnica. Encontrará una descripción concisa de los lípidos estructurados en INFORM, Vol. 8, No. 10, página 1004; titulado Structured lipids allow fat tailoring (octubre de 1997). Consulte también la patente de Estados Unidos n.º 4.871.768. Los lípidos estructurados son predominantemente triacilglicérols 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 nutrición enteral también se describen en las patentes de Estados Unidos n.º 6.194.379 y 6.160.007.

Opcionalmente, los ácidos grasos ω -3 pueden representar aproximadamente el 30 % de la mezcla de aceites, preferiblemente los ácidos grasos ω -3 compuestos principalmente por ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico. Los aceites alimenticios utilizados en la preparación de la composición nutricional generalmente contienen ácidos grasos ω -3 en forma de triglicéridos e incluyen, entre otros, el aceite de canola, los triglicéridos de cadena media y el aceite de pescado, soja, lecitina de soja, maíz, cártamo, girasol, girasol de alto contenido oleico, cártamo de alto contenido oleico, oliva, borraja, grosella negra, onagra y linaza. Opcionalmente, la relación de peso de los ácidos grasos ω -6 frente a ácidos grasos ω -3 en la mezcla de lípidos es de aproximadamente entre 0,1 y 3,0. La administración diaria de ácidos grasos ω -3 debe ser de al menos 450 mg y puede variar en función del peso corporal, sexo, edad y estado médica del individuo. Como se mencionó anteriormente, unos niveles más elevados son deseables para el consumo humano por parte de adultos: por ejemplo, entre 0,5 y 50 gm diarios, preferiblemente entre 2,5 y 5 gm diarios.

Una ventaja inesperada de combinar ácidos grasos ω -3 y HMB es la mejora del sabor del sustituto alimenticio. Las fuentes típicas de ácidos grasos ω -3 son los aceites de pescado y aceites procedentes de algas. Cada fuente aporta sabores desagradables al sustituto alimenticio. Los inventores descubrieron que al agregar HMB, pueden obtenerse los mismos o mejores resultados clínicos en relación con la prevención de la pérdida de peso involuntaria, incluso cuando se utilizaron niveles inferiores o inferiores de ácidos grasos ω -3 en el producto. Por lo tanto, los inventores han descubierto que existe una relación inversa entre los niveles de ácidos grasos ω -3 y de HMB. Por ejemplo, si 3 gm de ácidos grasos ω -3 administrados en 2 latas de un sustituto alimenticio constituyen una dosis efectiva, un producto formulado para contener 2 gm de ácidos grasos ω -3 y 1 gm de HMB administrados en 2 latas o un producto formulado para contener 1 gm de ácidos grasos ω -3 y 2 gm de HMB administrados en 2 latas mostrarían los mismos resultados clínicos. El producto formulado para contener solo 1 gm de ácidos grasos ω -3 tendrá un sabor mucho mejor que el producto formulado con 2 o 3 gm de ácidos grasos ω -3 y al mismo tiempo, obtendrá la misma eficacia clínica. Además, dado que se sabe que los ácidos grasos ω -3 son inhibidores del AA, un mediador de la inflamación, un producto que contenga ácidos grasos ω -3 y HMB podría tener beneficios más amplios que los que contengan cualquiera de los ingredientes por sí solo.

Las fuentes adecuadas de proteínas incluyen, entre otras, la leche, el suero de leche y las fracciones de suero de leche, la soja, el arroz, la carne (por ejemplo, carne de ternera), animales y vegetales (por ejemplo, guisantes, patatas), huevo (albúmina de huevo), la gelatina y el pescado. Las fuentes adecuadas de proteínas intactas incluyen, entre otras, las proteínas a base de soja y de leche, la caseína, la proteína de suero de leche, la proteína de arroz, el colágeno de ternera, la proteína de guisante, la proteína de patata y mezclas de los mismos.

Opcionalmente, la fuente de proteína intacta se enriquece con aminoácidos neutros de gran tamaño (ANGT) que comprenden valina, isoleucina, leucina, treonina, tirosina y fenilalanina. Típicamente, aproximadamente el 40 % de las fuentes de caseína, proteína de suero de leche y proteína de soja son aminoácidos neutros de gran tamaño. Por ejemplo, el caseinato contiene aproximadamente un 38 %P/P de aminoácidos neutros de gran tamaño, el concentrado de proteína de leche contiene aproximadamente un 39 %P/P de aminoácidos neutros de gran tamaño y el aislado de proteína de soja contiene aproximadamente un 34 %P/P de aminoácidos neutros de gran tamaño. Típicamente, el sustituto alimenticio está formulado con una fuente de proteína que suministra entre 1 y 25 gm de aminoácidos neutros de gran tamaño al día, preferiblemente entre 1 y 20 gm de aminoácidos neutros de gran

tamaño al día, más preferiblemente entre 4 y 20 gm de aminoácidos neutros de gran tamaño al día. Por ejemplo, un sustituto alimenticio consumido 3 veces al día que contenga una proteína que comprende 4,8 g de aminoácidos neutros de gran tamaño suministrará 14,4 g de aminoácidos neutros de gran tamaño al día.

- 5 Además, los sustitutos alimenticios contienen preferiblemente vitaminas y minerales en una cantidad diseñada para suplir o complementar los requisitos nutricionales diarios de la persona que recibe la fórmula. Los expertos en la materia son conscientes de que las fórmulas nutricionales a menudo incluyen un exceso de ciertas vitaminas y minerales para garantizar que cumplen con el nivel deseado a lo largo de la vida útil del producto. Asimismo, los expertos son conscientes de que ciertos microingredientes pueden ofrecer posibles beneficios para las personas
- 10 dependiendo de la enfermedad o dolencia subyacente que sufra el paciente. Por ejemplo, los pacientes de cáncer se benefician de antioxidantes como el betacaroteno, la vitamina E, la vitamina C y el selenio. Los productos alimenticios incluyen preferiblemente, entre otros, las siguientes vitaminas y minerales: calcio, fósforo, sodio, cloruro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, selenio, yodo, cromo, molibdeno, los nutrientes condicionalmente esenciales m-inositol, carnitina y taurina y vitaminas A, C, D, E, K y del grupo B y mezclas de las mismas.

- 15 El nutriente condicionalmente esencial carnitina es un aminoácido natural formado a partir de metionina y lisina. Su principal función metabólica se asocia al transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de las membranas mitocondriales, estimulando la oxidación de estas sustancias combustibles para obtener energía metabólica. El consumo de suplementos de carnitina es una herramienta metabólica importante en afecciones como las
- 20 enfermedades hepáticas y renales y las enfermedades crónicas graves o las lesiones graves complicadas por la desnutrición. Opcionalmente, los sustitutos alimenticios pueden suplementarse con carnitina a niveles suficientes para suministrar hasta 4 gm/día de carnitina.

- Los sustitutos alimenticios también pueden contener fibra y estabilizadores. Las fuentes adecuadas de fibra y/o
- 25 estabilizadores incluyen, entre otros, goma xantana, goma guar, goma arábica, goma ghatti, goma karaya, goma tragacanto, agar-agar, furcellaran, goma gellan, goma garrofín, pectina, pectina de bajo y alto metoxilo, glucanos de avena y cebada, carrageninas, psilio, gelatina, microcristalina, celulosa microcristalina, CMC (carboximetilcelulosa sódica), hidroxipropil metilcelulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil celulosa, DATEM (ésteres de ácido diacetil tartárico de mono- y diglicéridos), dextrano, carrageninas, FOS (fructooligosacáridos) y mezclas de los mismos.
- 30 Existen numerosas fuentes comerciales de fibras alimentarias solubles. Por ejemplo, la goma arábica, carboximetilcelulosa hidrolizada, goma guar, pectina y las pectinas de bajo y alto metoxilo están disponibles en TIC Gums, Inc. en Belcamp, Maryland (Estados Unidos). Los glucanos de avena y cebada están disponibles en Mountain Lake Specialty Ingredients, Inc. en Omaha, Nebraska (Estados Unidos). El psilio está disponible en Meer Corporation en North Bergen, Nueva Jersey y la carragenina está disponible en FMC Corporation en Philadelphia,
- 35 Pennsylvania (Estados Unidos).

- La fibra incorporada también puede ser una fibra alimentaria insoluble. Los ejemplos representativos de este tipo de fibras incluyen la fibra de salvado de avena, fibra de salvado de guisante, fibra de salvado de soja, fibra de cotiledón de soja, fibra de remolacha azucarera, celulosa y salvado de maíz. También están disponibles numerosas fuentes
- 40 de fibras alimentarias insolubles. Por ejemplo, el salvado de maíz está disponible en Quaker Oats en Chicago, Illinois; la fibra de salvado de avena, en Canadian Harvest en Cambridge, Minnesota; la fibra de salvado de guisante, en Woodstone Foods en Winnipeg, Canadá; la fibra de salvado de soja y la fibra de salvado de avena, en The Fibrad Group en LaVale, Maryland; la fibra de cotiledón de soja, en Protein Technologies International en St. Louis, Missouri; la fibra de remolacha azucarera, en Delta Fiber Foods de Minneapolis, Minnesota y la celulosa, en James
- 45 River Corp. en Saddle Brook, Nueva Jersey (Estados Unidos).

Un análisis más detallado de ejemplos de fibras y su incorporación a productos alimenticios puede encontrarse en la patente de Estados Unidos n.º 5.085.883, concedida a Garleb y col.

- 50 La cantidad de fibra utilizada en las fórmulas puede variar. El tipo concreto de fibra utilizado no es determinante. Puede utilizarse cualquier fibra apta para el consumo humano que sea estable en la matriz de un producto alimenticio.

- Además de la fibra, los sustitutos alimenticios también pueden contener oligosacáridos como fructooligosacáridos
- 55 (FOS) o glucooligosacáridos (GOS). Los oligosacáridos fermentan rápida y exhaustivamente a ácidos grasos de cadena corta gracias a los microorganismos anaeróbicos que habitan en el intestino grueso. Estos oligosacáridos constituyen fuentes de energía preferentes para la mayoría de las especies de bifidobacterias, pero no son utilizados por organismos potencialmente patógenos como clostridium perfringens, clostridium difficile o escherichia coli.

- 60 Típicamente, el FOS comprende entre 0 y 5 gm/ración del sustituto alimenticio, preferiblemente entre 1 y

5 gm/porción, más preferiblemente entre 2 y 4 gm/porción del sustituto alimenticio.

Los sustitutos alimenticios también pueden contener un aroma para mejorar su palatabilidad. Pueden agregarse edulcorantes artificiales para complementar el sabor y enmascarar el gusto salado. Los edulcorantes artificiales
5 útiles incluyen sacarina, nutrasweet, sucralosa, acesulfamo-K (ace-K), etc.

Los sustitutos alimenticios pueden fabricarse utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Existen diversas técnicas de procesamiento. Típicamente, estas técnicas incluyen la formación de una suspensión acuosa a partir de una o más soluciones, que puede contener agua y uno o más de los siguientes elementos:
10 hidratos de carbono, proteínas, lípidos, estabilizadores, vitaminas y minerales. Típicamente, el HMB se agrega a la suspensión de hidratos de carbono antes que el resto de minerales. La suspensión se emulsifica, homogeniza y enfría. Pueden agregarse otras soluciones a la suspensión antes de su procesamiento, después de su procesamiento o tanto antes como después. A continuación, la fórmula procesada se esteriliza y puede diluirse para secarla hasta convertirla en polvo, utilizarla como producto listo para su administración o envasarla en forma de
15 líquido concentrado. Si se desea que la fórmula resultante sea un líquido o concentrado listo para su administración, deberá agregarse una cantidad adecuada de agua antes de la esterilización.

Las composiciones sólidas, como las barritas, galletas, etc. también pueden fabricarse utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden fabricarse utilizando la tecnología de extrusión en frío conocida
20 en la técnica. Para preparar tales composiciones, típicamente se mezclan en seco todos los componentes en polvo. Este tipo de componentes típicamente incluyen las proteínas, las premezclas vitamínicas, ciertos hidratos de carbono, etc. Los componentes liposolubles se mezclan entre sí y se agregan a la premezcla en polvo anteriormente mencionada. Por último, los componentes líquidos se agregan a la composición, formando una masa o composición parecida al plástico.

25 La finalidad del proceso anteriormente descrito es obtener una masa plástica que pueda moldearse sin que se produzcan más cambios físicos o químicos, mediante el procedimiento conocido como conformado o extrusión en frío. En este proceso, la masa plástica se fuerza a pasar, a una presión relativamente baja, por un troquel que le confiere la forma deseada. A continuación, el exudado resultante se corta en la posición adecuada para obtener
30 productos con el peso deseado. Si se desea, el producto sólido se recubre para mejorar la palatabilidad y se envasa para su distribución. Típicamente, el paquete incluirá instrucciones de uso para el consumidor final (es decir, para el consumo por parte de pacientes con cáncer, para contribuir a impedir la pérdida de masa muscular magra, etc.).

Las composiciones sólidas también pueden fabricarse mediante horneado o extrusión en caliente para producir
35 cereales, galletas y galletitas saladas. Un experto en la materia sabría seleccionar uno de los muchos procesos de fabricación disponibles para producir el producto final deseado.

Como se señaló anteriormente, el HMB también puede incorporarse a zumos, bebidas no carbonatadas, bebidas carbonatadas, soluciones electrolíticas, aguas aromatizadas (en lo sucesivo, denominadas colectivamente
40 «bebidas»), etc. El HMB típicamente comprende entre 0,5 y 2 gm/ración de las bebidas. Los procedimientos de fabricación de estas bebidas se conocen en la técnica. Nos gustaría dirigir la atención del lector a la patente de Estados Unidos n.º 6.176.980 y 5.792.502. Por ejemplo, todos los ingredientes, incluido el HMB, se disuelven en un volumen adecuado de agua. Opcionalmente, pueden añadirse aromas, colorantes, vitaminas, etc. A continuación, la mezcla se pasteuriza, se envasa y se almacena hasta su envío.

45 La enfermedad que se desea tratar de acuerdo con las presentes reivindicaciones se selecciona de entre la enfermedad de Crohn u otras enfermedades intestinales inflamatorias (IBD).

La presente invención prevé, en una de sus realizaciones, el uso de hidroximetilbutirato o de sus sales para fabricar
50 un medicamento para la prevención o tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria mediante la regulación negativa de la expresión y/o de la actividad de la proteína quinasa C. Los Ejemplos I - IV demuestran que tanto el EPA como el HMB atenuaron la activación de la proteína quinasa C (PKC) provocada por PEG y la consiguiente degradación de IκBα, así como la acumulación nuclear del factor nuclear-κB (NF-κB).

55 La presente invención prevé, en otra realización, el uso de hidroximetilbutirato o de sus sales para fabricar un medicamento para la prevención o tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria mediante la regulación negativa de la expresión y/o de la actividad del factor nuclear kappa B. Los Ejemplos I - IV demuestran que tanto el EPA como el HMB atenuaron la activación de la proteína quinasa C (PKC) provocada por PEG y la consiguiente degradación de IκBα, así como la acumulación nuclear del factor nuclear-κB (NF-κB).

60

- La presente invención prevé, en otra realización, el uso de hidroximetilbutirato o de sus sales para fabricar un medicamento para la prevención o tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria mediante la regulación negativa de la expresión y/o de la actividad de las enzimas conjugadoras de ubiquitina. Los Ejemplos I - IV demuestran que esto estuvo acompañado de una reducción de la expresión la enzima conjugadora de ubiquitina E2_{14k}. La combinación de EPA y HMB fue al menos igual de efectiva o más efectiva que cualquiera de los tratamientos por sí solo. Estos resultados demuestran que tanto el EPA como el HMB preservan la masa muscular al atenuar la degradación proteica mediante la regulación negativa del aumento de la expresión de los componentes reguladores clave de la vía proteolítica ubiquitina-proteasoma.
- 10 La presente invención prevé, en otra realización, el uso de hidroximetilbutirato o de sus sales para fabricar un medicamento para la prevención o tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria mediante la regulación negativa de la expresión y/o de la actividad de los componentes del proteasoma 26S. Los Ejemplos I - IV demuestran que el HMB atenuó la actividad proteasómica, determinada por la actividad enzimática «similar a la quimotripsina». La expresión proteica de las subunidades α o β de 20S se redujo en al menos un 50 %, al igual que las subunidades de la ATPasa MSS1 y p42 de la subunidad reguladora de proteasoma 19S.

Ejemplo 1

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

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

Se obtuvieron ratones NMRI machos de cepa pura (con un peso promedio de 25 g) de nuestra propia colonia endogámica y se les trasplantaron fragmentos del tumor MAC16 s.c. en el costado por medio de un trocar, seleccionando de entre animales donantes con pérdida de peso consolidada como se describe en Bibby, M.C. y col. Characterization of a transplantable adenocarcinoma of the mouse colon producing cachexia in recipient animals. J. Natl. Cancer Inst., 78: 539-546, 1987. Se alimentó a los animales trasplantados con una dieta de cría de ratas y ratones (Special Diet Services, Witham, Reino Unido) y agua a voluntad, y la pérdida de peso fue evidente 10-12 días después de la implantación del tumor. Justo antes de desarrollar la pérdida de peso, los animales se asignaron aleatoriamente para recibir diariamente EPA (en aceite de oliva), HMB (en PBS) o la combinación que se describe en las leyendas de las figuras, administrados oralmente por sonda, mientras que los animales de control recibieron aceite de oliva o tampón fosfato salino. El EPA (al 98 % como ácido libre) se adquirió en Biomol Research Laboratories Inc. en PA, Estados Unidos. El HMB (como sal de calcio) se adquirió en Abbott Laboratories, Columbus, Ohio, Estados Unidos. Todos los grupos contenían un mínimo de 6 ratones. Se monitorizaron diariamente el volumen tumoral, el peso corporal y la ingesta de alimentos y agua. Se sacrificó a los animales por dislocación cervical cuando la pérdida de peso corporal alcanzó el 25 %, y todos los estudios se realizaron de acuerdo con las Directrices de UKCCCR para el bienestar y utilización de animales de laboratorio. Se diseccionaron rápidamente los músculos sóleos, junto con los tendones intactos, y se mantuvieron en solución salina isotónica helada antes de determinar la degradación proteica.

Los músculos sóleos recién diseccionados se fijaron mediante los tendones a soportes de alambre de aluminio, bajo tensión, a una longitud aproximada de reposo para evitar el acortamiento muscular y se preincubaron durante 45 minutos en 3 ml de tampón de bicarbonato de Krebs-Henseleit oxigenado (95 % oxígeno: 5 % dióxido de carbono) (pH 7,4) que contenía 5 mM de glucosa y 0,5 mM de cicloheximida. La degradación proteica se determinó mediante la liberación de tirosina durante un período de 2 horas, como se describe en Waalkes, T.P. y col. A fluorimetric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. J. Lab. Clin. Med., 50: 733-736, 1957.

La actividad funcional proteasómica se determinó midiendo la actividad enzimática «similar a la quimotripsina», la actividad proteolítica predominante de las subunidades β del proteasoma, de acuerdo con el procedimiento de Orino, E. y col. 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 enjuagaron con PBS frío, se picaron y se sometieron a ultrasonidos en 20 mM de Tris. HCl, pH 7,5, 2 mM ATP, 5 mM MgCl_2 y 1 mM DTT. A continuación, la muestra sometida a ultrasonidos se centrifugó durante 10 min a 18.000 g, a 4 °C, y se utilizó el sobrenadante para determinar la actividad enzimática «similar a la quimotripsina» mediante la liberación de aminometil cumarina (AMC) a partir del sustrato fluorogénico succinil - LLVY - AMC. La actividad se midió en ausencia y presencia del inhibidor proteasómico específico lactacistina (10 μM). Solo se consideró específica del proteasoma la actividad suprimible mediante lactacistina.

Las muestras de Western blot de proteína citosólica del músculo sóleo (entre 2 y 5 µg), obtenidas del ensayo anterior, se resolvieron en un 10 % de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µM (Hybond™, Amersham Life Science Products, Bucks, Reino Unido), que se había bloqueado con un 5 % de Marvel en PBS. Los anticuerpos primarios de MSS1 y p42 se utilizaron a una dilución de 1:5000, los de las subunidades α del proteasoma 20S, a 1:1500 y los de las subunidades β, a 1:1000, mientras que el anticuerpo de E2_{14k} se utilizó a una dilución de 1:500. Los anticuerpos secundarios se utilizaron a una dilución de 1:2000. Los anticuerpos monoclonales murinos frente a las subunidades α 1, 2, 3, 5, 6 y 7 del proteasoma 20S (clon MCP 231), la subunidad β3 del proteasoma 20S (HC10), la subunidad reguladora ATPásica 19S Rpt 1 (S7, Mss1; clon MSS1-104) y la subunidad reguladora ATPásica 19S Rpt 4 (S106, p42; clon p42-23) se adquirieron en Affiniti Research Products, Exeter, Reino Unido. Los antisueros policlonales de conejo frente a la enzima conjugadora de ubiquitina E2 (anticuerpo antiUBC2) fue un regalo del Dr. Simon Wing, Universidad McGill, Montreal, Quebec, Canadá. Los anticuerpos secundarios de cabra anticonejo y conejo antirratón conjugados con peroxidasa procedían de Dako Ltd., Cambridge, Reino Unido. La incubación se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente y se reveló por quimioluminiscencia (ECL; Amersham).

La figura 2 muestra una relación dosis-respuesta del HMB sobre la pérdida de peso en ratones portadores del tumor MAC16. Las dosis de HMB superiores a 0,125 g/kg causaron una reducción significativa de la pérdida de peso (figura 2A). Las diferencias con respecto al 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 estuvo acompañada de una alteración en la ingesta de alimentos y agua. Se seleccionó una dosis de 0,25 g/kg para todos los experimentos posteriores. La figura 3 muestra el efecto del HMB, del EPA y de la combinación de HMB y EPA sobre la pérdida de peso en ratones caquéticos portadores del tumor MAC16. Las diferencias con respecto al grupo de control se indican como a, p<0,05; b, p<0,01 o c, p<0,005. Se seleccionó una dosis subóptima de EPA para investigar las interacciones con el HMB. Todos los tratamientos causaron un aumento significativo del peso del músculo sóleo (figura 4A) y una reducción significativa de la liberación de tirosina (figura 4B), lo que indica una reducción de la degradación proteica total. Las diferencias con respecto al grupo de control con PBS se indican como a, p<0,05, b, p<0,01 o c, p<0,005. A las dosis seleccionadas, el HMB fue igual de efectivo que el EPA.

Se ha demostrado que la expresión proteasómica es elevada en los músculos gastrocnemio de los ratones portadores del tumor MAC16 y se ha demostrado que el EPA atenúa esta elevación de la expresión génica. Los resultados recogidos en la figura 5 muestran que el HMB atenuó la actividad funcional proteasómica, determinada por la actividad enzimática «similar a la quimotripsina», en la misma medida que el EPA a las dosis seleccionadas y que la combinación de HMB y EPA no produjo una reducción adicional de la actividad. Las diferencias con respecto al control se indican como c, p<0,005. La expresión proteica de las subunidades proteasómicas se analizó mediante Western blot de sobrenadantes procedentes de tejidos musculares sometidos a ultrasonidos. Tanto el HMB como el EPA atenuaron la expresión de las subunidades α del proteasoma 20S, las unidades estructurales del proteasoma, y hubo algunos indicios 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 al HMB se muestran como e, p<0,01. Asimismo, tanto el HMB como el EPA atenuaron la expresión de las subunidades β del proteasoma 20S, las unidades catalíticas del proteasoma, pero la combinación fue más efectiva que cualquiera de los dos agentes por sí solo (figura 6B). Las diferencias con respecto al control se indican como c, p<0,001.

La figura 7A muestra la expresión de MSS1, una subunidad ATPásica del complejo regulador del proteasoma 19S. Tanto el HMB como el EPA atenuaron la expresión de MSS1, pero no hay indicios de que la combinación produjese una reducción adicional. Se obtuvieron resultados similares con p42, otra subunidad de ATPásica del regulador de 19S, que fomenta la asociación dependiente de ATP del proteasoma 20S con el regulador de 19S para formar el proteasoma 26S (figura 7B). Las diferencias con respecto al control se indican como c, p<0,001. De nuevo, tanto el HMB como el EPA parecieron ser igualmente efectivos, mientras que la combinación pareció reducir aún más la expresión de p42. Tanto el HMB como el EPA redujeron, también, la expresión de la enzima conjugadora de ubiquitina E2_{14k}, mientras que la combinación provocó una nueva reducción 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 al HMB por sí solo se muestran como d, p<0,05 y f, p<0,001. Estos resultados confirman que el HMB es igual de efectivo que el EPA para atenuar la pérdida de masa muscular, la degradación proteica y la regulación negativa de la vía proteolítica ubiquitina-proteasoma y que este mecanismo parece ser el responsable de la preservación de la masa muscular en ratones caquéticos portadores del tumor MAC16.

Este estudio ha demostrado que el HMB es efectivo para atenuar el desarrollo de caquexia o la pérdida de peso involuntaria en ratones portadores del tumor MAC16 y produjo una reducción de la degradación proteica del músculo esquelético mediante la regulación negativa del aumento de la expresión de la vía ubiquitina-proteasoma. Por

consiguiente, el HMB es igual de efectivo que el EPA para reducir la expresión proteica de las subunidades α y β del proteasoma 20S, así como de dos subunidades del regulador de 19S MSS1 y p42, de la expresión de la actividad proteolítica de E2_{14k} y de la actividad proteolítica proteasómica.

5 Ejemplo II

Atenuación del crecimiento tumoral en animales

El estudio en animales que se describe en el Ejemplo I anterior también evaluó el efecto del HMB sobre la tasa de crecimiento tumoral en ratones caquécticos portadores del tumor MAC16. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo I.

La figura 2B muestra una relación dosis-respuesta del HMB por sí solo sobre la tasa de crecimiento tumoral en ratones portadores del tumor MAC16. 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 superiores a 0,125 g/kg causaron una reducción significativa de la tasa de crecimiento tumoral. La atenuación de la tasa de crecimiento tumoral no estuvo acompañada de una alteración en la ingesta de alimentos y agua.

Ejemplo III

Atenuación de la degradación proteica en miotubos murinos

Este estudio examina el efecto del HMB sobre la degradación proteica provocada por PEG y sobre las vías de señalización en miotubos murinos para determinar el mecanismo de atenuación del aumento de la expresión de la vía proteolítica ubiquitina-proteasoma.

Los miotubos C₂C₁₂ se inocularon rutinariamente en DMEM complementado con un 10 % de suero fetal de ternero, glutamina y un 1 % de penicilina-estreptomicina bajo atmósfera de CO₂ al 10 % en aire a 37 °C. Los miotubos se formaron permitiendo que los cultivos confluentes se diferenciaron en DMEM con un 2 % de suero equino, con cambios de medio cada 2 días.

La PEG se purificó de los tumores MAC16 sólidos (Todorov, P. y col. Characterization of a cancer cachectic factor. Nature, 379: 739-742, 1996.) extirpados a ratones con una pérdida de peso de entre el 20 y el 25 %. Los tumores se homogeneizaron en 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, con 0,5 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 0,5 mM de EGTA y 1 mM de ditiotreitolo a una concentración de 5 ml/g de tumor. Se agregó sulfato de amonio sólido al 40 % p/v y tras la eliminación del sulfato de amonio, el sobrenadante se sometió a cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos monoclonales anti-PEG acoplados a una matriz sólida, como se describe en Todorov, P. y col Induction of muscle protein degradation and weight loss by a tumor product. Cancer Res., 56: 1256-1261, 1996. Las fracciones inmunogénicas se concentraron y se utilizaron para estudios adicionales.

Los miotubos, depositados en multiplacas de seis pocillos, se etiquetaron como L-[2, 6-³H] fenilalanina (0,67 mCi/mmol) durante 24 horas en 2 ml de DMEM con un 2 % de suero equino. A continuación, se lavaron tres veces en PBS, seguidas de una incubación de 2 horas a 37 °C en DMEM sin rojo de fenol hasta que dejó de aparecer radiactividad en el sobrenadante. Posteriormente, estos miotubos se incubaron durante 24 horas más en presencia de PEG, con y sin EPA o HMB, en DMEM limpio sin rojo de fenol, para evitar el enfriamiento de los recuentos, y en presencia de 2 mM de fenilalanina fría para impedir la reincorporación de la radiactividad. La cantidad de radiactividad liberada en el medio se expresó como porcentaje de los cultivos de control no expuestos a PEG para determinar la degradación proteica total.

Para la medición de la liberación de ácido araquidónico, los miotubos, depositados en multiplacas de seis pocillos con 2 ml de DMEM con un 2 % de suero equino se etiquetaron durante 24 horas con 10 μ M de ácido araquidónico (con 1 μ Ci de [³H] araquidonato/ml) (Smith, H. y col. Effect of a cancer cachectic factor on protein synthesis / degradation in murine C2C12 myoblasts: Modulation by eicosapentaenoic acid. Cancer Res., 59: 5507-5513, 1999). A continuación, las células se lavaron exhaustivamente con PBS para eliminar los rastros de [³H] araquidonato no incorporado y se agregó EPA o HMB 2 horas antes de la PEG. Transcurridas otras 24 horas, se extrajo 1 ml de medio para determinar la radiactividad liberada.

La actividad funcional de las subunidades β del proteasoma se determinó como la actividad enzimática «similar a la quimotripsina» obtenida por fluorimetría de acuerdo con el procedimiento de Orino, E. y col. 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 PEG durante 24 horas, con o sin EPA o HMB agregado 2 horas antes de la PEG, y se determinó la actividad enzimática en una fracción sobrenadante (Whitehouse, A.S. y col. 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, 2003) mediante la liberación de aminometil cumarina (AMC) a partir de succinil-LLVY-AMC (0,1 mM) en presencia o ausencia del inhibidor proteasómico específico lactacistina (10 μ M) (Fenteany, G. y col. Lactacystin, proteasome function and cell fate. J. Biol. Chem., 273: 8545-8548, 1998). Solo se consideró específica del proteasoma la actividad suprimible mediante lactacistina. La actividad se ajustó en función de la concentración proteica de la muestra, determinada mediante ensayo de Bradford (Sigma Chemical Co., Dorset, Reino Unido) utilizando albúmina de suero bovino como patrón.

Para el análisis de Western blot, la proteína citosólica (entre 2 y 5 μ g) obtenida para el ensayo anteriormente mencionado se resolvió en un 10 % de SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ M, que se había bloqueado con un 5 % de Marvel en PBS a 4 °C durante la noche. Los anticuerpos primarios se utilizaron a una dilución de 1:100 (antiactina y PKC α); 1:500 (anti ERK1 y 2); 1:1000 (antisubunidad β del proteasoma 20S e I- κ B α); 1:1500 (antisubunidad α del proteasoma 20S) o 1:5000 (anti p42), mientras que los anticuerpos secundarios se utilizaron a una dilución de 1:2000. La incubación se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente y se reveló mediante ECL. La carga se cuantificó por concentración de actina.

Las proteínas de unión al ADN se extrajeron de los miotubos mediante el procedimiento de Andrews, N.C. y col. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. Nucleic Acids Res., 19: 2499, 1991, que emplea lisis hipotónica seguida de una extracción de núcleos con alto contenido en sal. El ensayo de unión EMSA (ensayo de cambio en la corrida electroforética) se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Dado que se cree que la PEG media en la degradación proteica y la activación de la vía proteolítica ubiquitina-proteasoma en ratones portadores del tumor MAC16, se realizaron estudios mecánicos sobre el efecto del HMB en la degradación proteica en miotubos murinos tratados con PEG. La degradación proteica total provocada por PEG con una curva típica de dosis-respuesta en forma de campana, como se señaló anteriormente en Gomes-Marcondes, y col Development of an in-vitro model system to investigate the mechanism of muscle protein catabolism induced by proteolysis-inducing factor. Br. J. Cancer, 86: 1628-1633, 2002, con un efecto máximo de 4 nM. Se ha demostrado anteriormente que el efecto del EPA (Smith, H.J. y col. 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. y col. Induction of protein catabolism in myotubes by 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid through increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway. Br. J. Cancer, 89: 737-745, 2003; y Whitehouse, A.S. y col. 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, 2003) es efectivo a 50 μ M, y los datos de la figura 9A demuestran que a una concentración de 50 μ M, tanto el HMB como el EPA fueron igual de efectivos para atenuar la degradación proteica provocada por PEG. También hubo cierta atenuación a 25 μ M de HMB con bajas concentraciones de PEG, pero no a altas concentraciones. Las diferencias con respecto al control en ausencia de PEG se indican como a, $p < 0,005$, mientras que las diferencias con respecto al control con PEG (para los grupos donde se agregó HMB o EPA) se indican como b, $p < 0,01$ y c, $p < 0,005$.

Se ha demostrado anteriormente que la degradación proteica provocada por PEG se debe a un aumento de la expresión de los componentes reguladores de la vía proteolítica ubiquitina-proteasoma por parte de Lorite, M.J., Smith, H.J., Arnold, J.A., Morris, A., Thompson, M.G. and 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 y 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: 1628-1633, 2002.

La actividad funcional de esta vía se mide por la actividad enzimática «similar a la quimotripsina», la actividad proteolítica predominante de las subunidades β del proteasoma. La FPI provocó un aumento de la actividad enzimática «similar a la quimotripsina», con un máximo de 4,2 nM. El efecto de la PEG quedó completamente atenuado por 50 μ M de EPA y tanto 25 como 50 μ M de HMB. (Figura 9B, las diferencias con respecto al control se indican como c, $p < 0,001$, mientras que las diferencias en la presencia de EPA o HMB se muestran como b, $p < 0,001$). Se observó un efecto similar en la expresión de las subunidades α y subunidades β del proteasoma 20S y p42, subunidad de ATPásica del regulador de 19S, que fomenta la asociación dependiente de ATP del proteasoma 20S con el regulador de 19S para formar el proteasoma 26S (figura 10). En todos los casos, la expresión se vio

incrementada por PEG a 4,2 y 10 nM y atenuada por EPA y HMB a 50 μ M, pero no a 25 μ M. Estos resultados confirman que el HMB atenúa la degradación proteica mediante un efecto sobre la inducción por PEG de la vía ubiquitina-proteasoma.

5 Ejemplo IV

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

El estudio *in vitro* que se describe anteriormente en el Ejemplo III también evaluó el efecto del HMB en moléculas que son mediadoras clave en la vía inflamatoria. Este experimento se realizó como se describe en el Ejemplo III.

Se ha demostrado que la activación de la PKC activa la cascada de las quinasas extracelulares reguladas por señal (ERK) de las vías MAPK de señalización (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 ERKs activadas, por ejemplo, ERK1 (o p44 MAPK) y ERK2 (o p42 MAPK) son capaces de fosforilar y, en consecuencia, de activar la fosfolipasa citosólica A2, la enzima que limita la velocidad en las vías que suponen la liberación de ácido araquidónico en la inflamación. Además, se ha demostrado que la PEG induce la fosforilación de la p42 / 44 MAPK, mientras que la MAPK total permaneció inalterada y que participa en la expresión proteasómica provocada por FPI (Smith, H.J. y col. Signal transduction pathways involved in proteolysis-inducing factor induced proteasome expression in murine myotubes. *Br. J. Cancer*, 89: 1783-1788, 2003). La figura 12 muestra el efecto del EPA y HMB en este proceso. La PEG indujo un aumento de fosforilación de p42 / 44, con un máximo de 4,2 nM y este efecto quedó completamente atenuado tanto por EPA como por HMB a 50 μ M, pero no por HMB a 25 μ M. La capacidad del HMB para atenuar la fosforilación de ERK 1/2 puede ser importante para la inhibición de la expresión proteasómica provocada por PEG mediante HMB.

Los experimentos que emplearon mutantes de PKC e inhibidores de esta enzima muestran que esta forma un mediador central de la señalización intracelular por PEG. Es probable que la PKC esté implicada en la fosforilación (y degradación) de I- κ B α , provocando la acumulación nuclear de NF- κ B y un aumento de la transcripción genética. La PEG estimula la translocación de PKC α del citoplasma a la membrana plasmática (fig. 11), teniendo como resultado una activación con un efecto máximo a 4,2 nM PEG, como con la degradación proteica (fig. 9). Tanto el EPA como el HMB a 50 μ M atenuaron efectivamente este efecto; mientras que el HMB resultó menos efectivo a 25 μ M (fig. 11). Esto sugiere que el HMB atenúa la estimulación de la PKC inducida por FPI mediante la inhibición de la PKC.

Como se señaló anteriormente, la PEG induce la degradación de I- κ B α y estimula la acumulación nuclear de NF- κ B y se ha demostrado que este proceso queda atenuado por 50 μ M de EPA (Whitehouse, A.S. y col. 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, 2003). Los resultados de la figura 13A muestran que el HMB a 50 μ M atenúa efectivamente la degradación de I- κ B α en presencia de PEG en miotubos murinos y previene la acumulación nuclear de NF- κ B (figura 13C). Las diferencias con respecto a 0nM PEG se muestran como b, $p < 0,01$ y c, $p < 0,001$. Solo 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 0nM PEG se muestran como b = $p < 0,01$ y c = $p < 0,001$. Las diferencias entre 50 μ M de HMB y PEG tratada frente a PEG por sí sola a la misma concentración se muestran como e= $p < 0,01$ y f= $p < 0,001$. Estos resultados sugieren que el efecto general del HMB es comparable al del EPA en la prevención del movimiento de NF- κ B hacia el núcleo con activación concomitante de la expresión génica.

Por lo tanto, el HMB parece ser un agente efectivo para el tratamiento de la inflamación inducida por citocinas y el desgaste muscular en la caquexia por cáncer. Parece que el HMB ejerce su efecto por inhibición de la actividad de la PKC y la estabilización resultante del complejo citoplasmático I κ B / NF- κ B. Dado que estas moléculas son mediadoras clave en la vía inflamatoria, el HMB parece ser un compuesto antiinflamatorio.

Ejemplo V

55 **Composición de un producto alimenticio para impedir la pérdida de peso involuntaria**

La lista específica de materiales para la fabricación del producto alimenticio de este ejemplo se presenta en la tabla 1. Por supuesto, pueden realizarse diversos cambios en los ingredientes y cantidades específicos sin apartarse del alcance de la invención.

60

TABLA 1: LISTA DE MATERIALES

INGREDIENTE	CANTIDAD (KG)
AGUA	316
ULTRATRACE/TRACE MINERAL PREMIX	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 POTÁSICO	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 DIBÁSICO DE MAGNESIO	0,26
FOSFATO TRIBÁSICO DE MAGNESIO	0,99
CLORURO DE MAGNESIO	1,2
SUCROSA	11,9
FRUCTOOLIGOSACÁRIDO	5,9
TRIGLICÉRIDOS DE CADENA MEDIA	2,6
ACEITE DE CANOLA	1,5
ACEITE DE SOJA	0,87
PALMITATO DE VITAMINA A AL 57 %	0,007
PREMEZCLA DE VITAMINAS DEK	0,04
VITAMINA D	0,0000088
D-ALFA-TOCOFEROL ACETATO	0,036
FILOQUINONA	0,00006
CARRAGENINA	0,03
LECITINA DE SOJA	0,6
CASEINATO DE SODIO	15,5
CASEINATO DE CALCIO	4,2
MONOHIDRATO DE CALCIO DE HMB	2,6
AISLADO DE PROTEÍNA DE LECHE	14
ACEITE DE SARDINA REFINADO DESODORIZADO	6,9
ÁCIDO ASCÓRBICO	0,12
HIDRÓXIDO DE POTASIO AL 45 %	0,13
TAURINA	0,12
PREMEZCLA DE VITAMINAS SOLUBLES EN AGUA	0,11
NIACINAMIDA	0,017
PANTOTENATO DE CALCIO	0,01
CLORHIDRATO DE CLORURO DE TIAMINA	0,003
CLORHIDRATO 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
AROMA N&A MALVAVISCO VAINILLA	1,6
AROMA N&A DULCE DE LECHE	0,27

El producto alimentario líquido se fabricó preparando tres suspensiones que se mezclaron entre sí, se combinaron con aceite de sardina refinado desodorizado, se trataron térmicamente, se estandarizaron, envasaron y se esterilizaron. El proceso de fabricación de 454 kg (1000 libras) del producto alimenticio líquido, mediante la lista de materiales de la Tabla 7, se describe en detalle a continuación.

Se prepara una suspensión de hidratos de carbono/minerales calentando primero aproximadamente 62,6 kg de agua a una temperatura en un intervalo de entre aproximadamente 71 °C y 77 °C con agitación. El HMB se agrega al agua y se disuelve agitando la solución resultante durante al menos cinco minutos. La cantidad requerida de citrato de potasio y de premezcla de minerales ultratraza/traza se agrega al agua y se disuelve agitando la solución resultante durante al menos 10 minutos. A continuación se agregan, en el orden indicado y con alta agitación, los siguientes minerales: cloruro de magnesio, cloruro de potasio, citrato de sodio, yoduro de potasio, fosfato de magnesio y fosfato tricálcico. Se deja que se mezcle la suspensión con agitación moderada hasta su completa disolución o dispersión. Entonces, se agregan el jarabe de maíz, la sacarosa y la maltodextrina a la suspensión con agitación. Agregue la cantidad requerida de fructooligosacáridos y deje que se mezcle. La suspensión de hidratos de carbono/minerales terminada se mantiene, con alta agitación, a una temperatura en un intervalo de entre aproximadamente 60 y 66 °C durante no más de 8 horas hasta que se mezcle con las otras suspensiones.

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

Se prepara una suspensión de proteínas calentando primero aproximadamente 196,78 kg de agua a una temperatura en un intervalo de entre aproximadamente 60 y 63 °C con agitación. El caseinato de calcio, el caseinato de sodio y el aislado de proteína de leche se mezclan con la suspensión mediante un dispositivo de mezclado. La suspensión proteínica terminada se mantiene, con agitación, a una temperatura en un intervalo de entre aproximadamente 54 y 60 °C durante no más de 2 horas antes de mezclarla con las otras suspensiones.

El aceite y la suspensión proteica se mezclan entre sí con agitación y la suspensión mezclada resultante se mantiene a una temperatura en un intervalo de entre aproximadamente 54 y 66 °C. Tras esperar durante al menos cinco minutos, la suspensión de hidratos de carbono/minerales se agrega a la suspensión mezclada del paso anterior con agitación y la suspensión mezclada resultante se mantiene a una temperatura en un intervalo de entre aproximadamente 54 y 66 °C. A continuación, se agrega el aceite de sardina refinado desodorizado a la suspensión con agitación. (En un procedimiento de fabricación más preferido, el aceite de sardina se dosifica y se agrega lentamente al producto a medida que la suspensión pasa a través de un conducto a una velocidad constante). Preferiblemente transcurridos al menos 5 minutos, se determina el pH de la suspensión mezclada. Si el pH de la suspensión mezclada es inferior a 6,55, se ajusta con hidróxido de potasio diluido a un pH de entre 6,5 y 6,8.

Tras 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 temperaturas ultra altas (UHT) y homogeneización, como se describe a continuación: utilice una bomba positiva para suministrar la suspensión mezclada para este procedimiento; caliente la suspensión mezclada a una temperatura en un intervalo de entre aproximadamente 66 y 71 °C; desairee la suspensión mezclada a entre 25,4 y 38,1 cm de Hg; emulsione la suspensión mezclada a entre 61 y 75 atmósferas; caliente la suspensión mezclada a una temperatura en un intervalo de entre aproximadamente 120 y 122 °C haciéndola pasar a través de un intercambiador de calor de placas/bobinas con un tiempo de retención de aproximadamente 10 segundos; caliente a UHT la suspensión mezclada a una temperatura en un intervalo de entre aproximadamente 144 y 147 °C con un tiempo de retención de aproximadamente 5 segundos; reduzca la temperatura de la suspensión mezclada para que se encuentre en el intervalo de entre aproximadamente 120 y 122 °C haciéndola pasar a través de un enfriador instantáneo; reduzca la temperatura de la suspensión mezclada para que se encuentre en el intervalo de entre aproximadamente 71 y 82 °C haciéndola pasar a través de un intercambiador de calor de placas/bobinas; homogenice la suspensión mezclada a entre 265 y 266 atmósferas; haga pasar la suspensión mezclada a través de un tubo de retención durante al menos 16 segundos a una temperatura en un intervalo de entre aproximadamente 74 y 85 °C y enfríe la suspensión mezclada a una temperatura en un intervalo de entre aproximadamente 1 y 70 °C haciéndola pasar a través de un intercambiador de calor de grandes dimensiones.

Conserve la suspensión mezclada a una temperatura en un intervalo de entre aproximadamente 1 y 7 °C, preferiblemente con agitación.

Preferiblemente en este momento, se realizan las pruebas analíticas correspondientes de control de calidad. Basándose en los resultados de las pruebas, se agrega una cantidad adecuada de agua de dilución (a entre 10 y

38 °C) a la suspensión mezclada con agitación.

Se preparan por separado una solución vitamínica y una solución de aromas y a continuación, se agregan a la suspensión mezclada.

5

La solución vitamínica se prepara calentando aproximadamente 3,94 kg de agua a una temperatura en un intervalo de entre aproximadamente 43 y 66 °C con agitación y añadiendo a continuación los siguientes ingredientes, en el orden indicado: ácido ascórbico, hidróxido de potasio al 45 %, taurina, premezcla de vitaminas solubles en agua, cloruro de colina y L-carnitina. A continuación, la solución vitamínica se agrega a la suspensión mezclada con

10 agitación.

La solución de aromas se prepara añadiendo los aromas de malvavisco y dulce de leche a aproximadamente 7,94 kg de agua con agitación. Se ha fabricado un producto alimenticio utilizando un aroma artificial de malvavisco distribuido por Firmenich Inc., Princeton, New Jersey, EE. UU. y un aroma natural y artificial de dulce de leche

15 distribuido por Firmenich Inc. A continuación, la solución de aromas se agrega a la suspensión mezclada con agitación.

Si es necesario, se agrega hidróxido de potasio diluido a la suspensión mezclada de forma que el producto tenga un pH en un intervalo de entre 6,4 y 7,0 después de la esterilización. El producto terminado se coloca en recipientes

20 adecuados y se somete a esterilización. Por supuesto, si se desea, puede emplearse el procesamiento aséptico.

Ejemplo VI

Composición de un producto alimenticio para controlar la respuesta glucémica

25

La tabla 2 presenta una lista de materiales para la fabricación de 1000 kg de un producto alimenticio líquido que proporcione nutrientes a una persona, pero limite la respuesta insulínica resultante. A continuación, se incluye una descripción detallada de su fabricación.

30

Tabla 2: lista de materiales para un producto alimenticio líquido

Ingrediente	Cantidad por 1000 kg
Agua	CS
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 de sodio	1,134 kg
Fosfato de magnesio	1,028 kg
Monohidrato de calcio de HMB	5,7 kg
m-inositol	914,5 gm
Vitamina C	584 gm
Cloruro potásico	530 gm
Cloruro de colina	472,1 gm
Hidróxido de sodio al 45 %	402,5 gm
Premezcla UTM/TM	369,3 gm
Fosfato de potasio	333 gm

Carnitina	230,5 gm
Goma gellan	125 gm
Taurina	100,1 gm
Vitamina E	99 gm
Ésteres de luteína (5 %)	92 gm
Premezcla vitaminas solubles en agua	75,4 gm
Premezcla de vitaminas DEK	65,34 gm
Beta caroteno al 30 %	8,9 gm
Vitamina A	8,04 gm
Clorhidrato de piridoxina	3,7 gm
Cloruro de cromo	1,22 gm
Ácido fólico	0,64 gm
Yoduro de potasio	0,20 gm
Cianocobalamina	0,013 gm
Premezcla vitaminas solubles en agua (por g de premezcla): 375 mg/g de niacinamida, 242 mg/g de pantotenato de calcio, 8,4 gm/g de ácido fólico, 62 mg/g de cloruro de tiamina, 48,4 gm/g de riboflavina, 59,6 mg/g de clorhidrato de piridoxina, 165 mcg/g de cianocobalamina y 7305 mcg/g de biotina Premezcla de vitaminas DEK (por g de premezcla): 8130 IU/g de vitamina D3, 838 IU/g de vitamina E, 1,42 mg/g de vitamina K ₁ premezcla UTM/TM (por g de premezcla): 45,6 mg/g de zinc, 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 de molibdeno	

Los productos alimenticios líquidos para diabéticos se fabrican preparando cuatro suspensiones que se mezclan entre sí, se tratan térmicamente, se estandarizan, se envasan y se esterilizan.

- 5 Se prepara una suspensión de hidratos de carbono/minerales calentando primero aproximadamente 82 kg de agua a una temperatura de entre aproximadamente 65 °C y aproximadamente 71 °C con agitación. Con agitación, se agrega la cantidad requerida de HMB de calcio y se agita durante 5 minutos. Se agrega la cantidad requerida de citrato de sodio y goma gellan distribuida por Kelco, Division of Merck and Company Incorporated, San Diego, California, EE. UU. y se agita durante 5 minutos. Se agrega la cantidad requerida de la premezcla de minerales
- 10 ultratraza/traza (UTM/TM) (distribuida por Fortitech, Schenectady, Nueva York, EE. UU.). La suspensión es de color amarillo verdoso. Se mantiene la agitación hasta que los minerales se dispersen por completo. Con agitación, se agregan las cantidades requeridas de los siguientes minerales: citrato de potasio, cloruro de cromo, cloruro de magnesio y yoduro de potasio. A continuación, se agregan la primera maltodextrina distribuida por Grain Processing Corporation, Muscatine, Iowa, EE. UU. y la fructosa a la suspensión con alta agitación y se deja que se disuelvan.
- 15 Con agitación, se agregan las cantidades requeridas de polvo de maltitol distribuido por Roquette America, Inc, Keokuk, Iowa, EE. UU. y el jarabe de maltitol distribuido por AlGroup Lonza, Fair Lawn, Nueva Jersey, EE. UU., los fructooligosacáridos distribuidos por Golden Technologies Company, Golden, Colorado, EE. UU. y una segunda maltodextrina distribuida por Matsutani Chemical Industry Co, Hyogo, Japón bajo el nombre de producto Fibersol® 2(E) y se agitan bien hasta que se disuelven por completo. Se agrega la cantidad necesaria de fosfato tricálcico y
- 20 fosfato de magnesio a la suspensión con agitación. La suspensión de hidratos de carbono/minerales terminada se mantiene, con agitación, a una temperatura de entre aproximadamente 65 °C y aproximadamente 71 °C durante no más de doce horas hasta que se mezcle con las otras suspensiones.

- Se prepara una suspensión de fibra en aceite combinando y calentando las cantidades requeridas de aceite de
- 25 cártamo de alto contenido oleico y aceite de canola a una temperatura de entre aproximadamente 40,5 °C y aproximadamente 49 °C con agitación. Con agitación, se agregan las cantidades requeridas de ésteres de luteína de Cognis de LaGrange, EE. UU. Se agita durante un mínimo de 15 minutos. Con agitación, se agregan al aceite caliente las cantidades requeridas de los siguientes ingredientes: lecitina (distribuida por Central Soya Company, Fort Wayne, Indiana, EE. UU.), premezcla de vitaminas D, E y K (distribuida por Vitamins Inc., Chicago, Illinois,
- 30 EE. UU.), vitamina A, vitamina E y betacaroteno. Se disuelven lentamente las cantidades requeridas de polisacárido de soja distribuidas por Protein Technology International, St. Louis, Missouri, EE. UU. en el aceite caliente. La suspensión de aceite/fibra terminada se mantiene, con agitación moderada, a una temperatura de entre aproximadamente 55 °C y aproximadamente 65 °C durante un plazo de no más de doce horas hasta que se mezcle con las otras suspensiones.

35

Se prepara una primera suspensión de proteínas en agua calentando 293 kg de agua a entre 60 °C y 65 °C. Con agitación, se agrega la cantidad requerida de solución de citrato de potasio al 20 % y se mantiene durante un

minuto. Se agrega la cantidad requerida de caseína ácida con alta agitación, seguida inmediatamente de la cantidad requerida de hidróxido de sodio al 20 %. La agitación se mantiene alta hasta que se disuelve la caseína. La suspensión se mantiene a entre aproximadamente 60 °C y 65 °C con agitación moderada.

- 5 Se prepara una segunda suspensión de proteínas calentando primero aproximadamente 77 kg de agua a una temperatura de aproximadamente 40 °C con agitación. Se agrega el caseinato y la solución se agita bien hasta que el caseinato se disperse por completo. Con agitación continua, se calienta lentamente la solución a entre 60 °C y 65 °C. La suspensión se mantiene durante no más de doce horas hasta que se mezcla con las otras suspensiones.
- 10 El lote se ensambla mezclando 344 kg de suspensión de proteínas uno con 84 kg de suspensión de proteínas dos. Con agitación, se agregan los 37 kg de la suspensión de aceite/fibra. Tras esperar al menos un minuto, se agregan 216 kg de suspensión de hidratos de carbono/minerales a la suspensión mezclada del paso anterior con agitación y la suspensión mezclada resultante se mantiene a una temperatura de entre aproximadamente 55 °C y aproximadamente 60 °C. El pH del lote mezclado se ajusta a un pH de entre 6,45 y 6,75 con hidróxido de potasio
- 15 1N.

Tras esperar durante un plazo de no menos de un minuto ni de más de dos horas, la suspensión mezclada se somete a desaireación, tratamiento a temperaturas ultraaltas y homogeneización. La suspensión mezclada se calienta a una temperatura de entre aproximadamente 71 °C y aproximadamente 82 °C y se desairea al vacío. A

- 20 continuación, la suspensión calentada se emulsiona mediante un homogeneizador de una sola etapa a entre 900 y 1100 psig. Tras la emulsificación, la suspensión se calienta a entre aproximadamente 99 °C y aproximadamente 110 °C y a continuación, se calienta a una temperatura de aproximadamente 146 °C durante aproximadamente 5 segundos. Se hace pasar la suspensión a través de un enfriador instantáneo para reducir la temperatura de entre aproximadamente 99 °C y aproximadamente 110 °C y a continuación, a través de un intercambiador de calor de
- 25 placas para reducir la temperatura de entre aproximadamente 71 °C y aproximadamente 76 °C. A continuación, la suspensión se homogeniza a entre 3900 y 4100 / entre 400 y 600 psig. La suspensión se mantiene a entre aproximadamente 74 °C y aproximadamente 80 °C durante 16 segundos y a continuación, se enfría a entre 1 °C y aproximadamente 7 °C. En este punto, se toman muestras para realizar pruebas microbiológicas y analíticas. La mezcla se mantiene con agitación.
- 30 Se prepara por separado una solución de vitaminas solubles en agua (VSA) y se agrega a la suspensión mezclada procesada.

- La solución vitamínica se prepara añadiendo los siguientes ingredientes a 9,4 kg de agua con agitación: Premezcla
- 35 de vitaminas solubles en agua (distribuida por J.B. Laboratories, Holland, Michigan, EE. UU.), vitamina C, cloruro de colina, L-carnitina, taurina, inositol, ácido fólico, clorhidrato de piridoxina y cianocobalamina. Se agrega la cantidad requerida de suspensión de hidróxido de potasio al 45 % se añade para ajustar el pH a entre 7 y 10.

- Basándose en los resultados analíticos de las pruebas de control de calidad, se agrega una cantidad adecuada de
- 40 agua al lote con agitación para conseguir los sólidos totales deseados. Además, se añaden 8,8 kg de solución vitamínica al lote diluido con agitación.

El pH del producto puede ajustarse para conseguir una estabilidad óptima del producto. El producto terminado se coloca en recipientes adecuados y se somete a esterilización terminal.

45

Ejemplo VII

Composición de un producto alimenticio pediátrico

- 50 La tabla 3 presenta una lista de materiales para la fabricación de 771 kg de un producto alimenticio pediátrico enteral. A continuación, se incluye una descripción detallada de su fabricación.

Tabla 3: lista de materiales para un producto alimenticio pediátrico con sabor a vainilla

Ingrediente	Cantidad por 771 kg
Solución madre de suspensión PEG	
Aceite de cártamo rico en oleico	40,7 kg
Aceite de soja	24,4 kg
Aceite de TCM	16,3 kg
Lecitina	840,2 g
Monoglicéridos	840,2 g

Carragenina	508,9 g
Caseinato	32,8 kg
Mezcla de vitaminas solubles en aceite	
Premezcla de DEK	83,3 g
Vitamina A	7,1 g
Ésteres de luteína (5 %)	92 g
Suspensión PEA	
Agua	530 kg
Caseinato	11,3 kg
Proteína sérica	11,9 kg
Solución madre de suspensión MIN	
Agua	18 kg
Goma de celulosa	1696 g
Monohidrato de calcio de HMB	4,4kg
Cloruro de magnesio	2,7 kg
Cloruro potásico	1,0 kg
Citrato de potasio	2,7 kg
Yoduro de potasio	0,25g
Fosfato dipotásico	1,45 kg
Mezcla definitiva	
Suspensión de PEA	251 kg
Suspensión PEG	53 kg
Suspensión MIN	12,6 kg
Cloruro sódico	127,4 g
Sacarosa	77,6 kg
Fosfato tricálcico	2,5 kg
Agua	167 kg
Solución madre de suspensión vitaminas solubles en agua	
Agua	31,7 kg
Citrato de potasio	3,74 g
Premezcla UTM/TM	172,2 g
Premezcla vitaminas solubles en agua	134,1 g
m-inositol	176,7 g
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
Hidróxido de potasio al 45 %	341 g
Solución madre de vainilla	
Agua	38,5 kg
Aroma de vainilla	4,3 kg
Premezcla DEK: (por gm de premezcla) 12.100 IU de vitamina D ₃ , 523 IU de vitamina E, 0,962 mg de vitamina K ₁ Premezcla UTM/TM: (por gm de premezcla) 132 mg de zinc, 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 de vitaminas solubles en agua: (por gm de premezcla) 375 mg de niacinamida, 242 mg pantotenato de calcio d, 8,4 mg de ácido fólico, 62 mg de cloruro de tiamina, 48,4 mg de riboflavina, 59,6 mg de clorhidrato de piridoxina, 165,5 mcg de cianocobalamina y 7305 mcg de biotina	

La mezcla de vitaminas solubles en aceite (mezcla de ASAc) se prepara pesando la cantidad especificada de premezcla de vitaminas DEK en un recipiente protegido de la luz con tapón de rosca lo suficientemente grande como para contener 54 g de vitaminas solubles en aceite. Con una pipeta de plástico se agrega la cantidad requerida de 5 vitamina A a la parte alícuota de DEK. El recipiente se aclara con nitrógeno antes de colocar la tapa.

La suspensión de proteína en grasa (PEG) se preparó agregando las cantidades requeridas de aceite de cártamo de

alto contenido oleico, aceite de soja y aceite de TCM al recipiente de mezcla. La mezcla se calienta a entre 40,5 °C y 49 °C con agitación. Con agitación, se agregan las cantidades requeridas de ésteres de luteína de American River Nutrition en Hadley, Massachusetts, EE. UU. Se agita durante un mínimo de 15 minutos. Se agregan los emulsionantes, lecitina (distribuida por Central Soya en Decatur, Indiana, EE. UU.) y monoglicéridos (distribuidos por Quest en Owings Mills, Maryland, EE. UU.) y se mezclan bien para que se disuelvan. A continuación, se añade toda la mezcla de vitaminas solubles en aceite. Los recipientes se aclaran 4 o 5 veces con la mezcla de aceites para garantizar que las vitaminas se transfieren por completo. Se agregan la carragenina (distribuida por FMC en Rockland, Maine, EE. UU.) y el caseinato. La suspensión se mezcla bien para dispersar la proteína. La suspensión de PEG se mantiene hasta seis horas a entre 60 y 65 °C con agitación moderada hasta su uso.

10

La suspensión de proteína en agua (PEA) se prepara agregando la cantidad requerida de agua a un recipiente de mezcla. El agua se mantiene con agitación moderada y se calienta a una temperatura de entre 76 y 82 °C. Se agrega la cantidad requerida de caseinato al agua con alta agitación y se mezcla con alta agitación hasta que la proteína se disperse por completo. La suspensión de proteínas se deja enfriar a entre 54 y 60 °C antes de continuar.

15 Una vez enfriada, se agrega la cantidad requerida de proteína sérica y se mezcla bien hasta su completa dispersión/disolución. La suspensión de PEA se mantiene hasta dos horas a entre 54 y 60 °C hasta su uso.

La solución madre de minerales (SMM) se prepara agregando la cantidad requerida de agua a un recipiente de mezcla y se calienta a entre 60 y 68 °C. La mezcla de goma de celulosa (distribuida por FMC en Newark, Delaware, EE. UU.) se agrega al agua y se mantiene con agitación moderada durante un mínimo de cinco minutos antes de continuar. Se agrega el HMB de calcio y se agita durante un mínimo de cinco minutos antes de continuar. Se agregan una a una las sales minerales cloruro de magnesio, cloruro de potasio, citrato de potasio, yoduro de potasio y fosfato dipotásico mezclando entre cada adición para garantizar que se disuelvan los minerales. La solución madre de minerales terminada se mantiene a entre 54 y 65 °C con agitación baja a moderada hasta su uso.

25

La mezcla final se prepara agregando la cantidad especificada de suspensión PEA a un recipiente de mezcla y se calienta con agitación a entre 54 y 60 °C. Se agrega la cantidad especificada de suspensión PEA al recipiente y se mezcla bien. Se agrega la cantidad especificada de SMM a la mezcla y se mezcla bien. Se agrega la cantidad especificada de cloruro sódico a la mezcla y se mezcla bien. Se agrega la cantidad especificada de sacarosa a la mezcla y se mezcla bien. Se agrega el fosfato tricálcico a la mezcla y se mezcla bien para dispersarlo. Se agrega la cantidad especificada de agua adicional a la mezcla y se mezcla bien. La mezcla definitiva terminada se mantiene, con agitación, a entre 54 y 60 °C. Si es necesario, se ajusta el pH a entre 6,45 y 6,8 con hidróxido de potasio 1N.

30

Tras esperar durante un plazo de no menos de un minuto ni de más de dos horas, la suspensión mezclada se somete a desaireación, tratamiento a temperaturas ultraaltas y homogeneización. La suspensión mezclada se calienta a una temperatura de entre aproximadamente 68°C y aproximadamente 74°C y se desairea al vacío. A continuación, la suspensión calentada se emulsiona a entre 900 y 1100 psig. Tras la emulsificación, la suspensión se calienta a entre aproximadamente 120 °C y aproximadamente 122 °C y a continuación, se calienta a una temperatura de entre aproximadamente 149 °C y aproximadamente 150 °C. Se hace pasar la suspensión a través de un enfriador instantáneo para reducir la temperatura de entre aproximadamente 120 °C y aproximadamente 122 °C y a continuación, a través de un intercambiador de calor de placas para reducir la temperatura de entre aproximadamente 74 °C y aproximadamente 79 °C. A continuación, la suspensión se homogeniza a entre 3900 y 4100 / entre 400 y 600 psig. La suspensión se mantiene a entre aproximadamente 74 °C y aproximadamente 85 °C durante 16 segundos y a continuación, se enfría a entre 1° C y aproximadamente 6 °C. En este punto, se toman muestras para realizar pruebas microbiológicas y analíticas. La mezcla se mantiene con agitación.

45

La estandarización se realiza de la siguiente manera. La solución madre de vitaminas (VSA) se prepara calentando la cantidad de agua especificada a entre 48 y 60 °C en un recipiente de mezcla. Se agregan el citrato de potasio, la premezcla UTM/TM (distribuida por Fortitech en Schenectady, Nueva York, EE. UU.), la premezcla de SVA, el m-inositol, la taurina, la L-carnitina y el cloruro de colina a la solución en el orden indicado y se deja que se mezclen bien hasta disolver o dispersar cada ingrediente. Se agregan 14,2 kg de la solución vitamínica al recipiente de mezcla procesada.

50

La solución madre de vainilla se prepara calentando la cantidad de agua especificada en un recipiente de mezcla. Se agrega la cantidad especificada de vainilla (distribuida por Givaudan Roure en Cincinnati, Ohio, EE. UU.) al agua y se mezcla bien. Se agregan 18,5 kg de solución de vainilla al recipiente de mezcla procesada y se mezcla bien.

55

La solución madre de ácido ascórbico se prepara agregando la cantidad de agua requerida a un recipiente de mezcla. Se agrega la cantidad especificada de ácido ascórbico y se mezcla bien para disolverlo. Se agrega la cantidad especificada de hidróxido de potasio al 45 % y se mezcla bien. Se agregan 8,4 kg de solución de ácido

60

ascórbico al recipiente de mezcla y se mezcla bien.

La mezcla definitiva se diluye hasta conseguir los sólidos totales definitivos agregando 92,5 kg de agua y se mezcla bien. El producto se introduce en recipientes adecuados antes de la esterilización terminal (en retorta).

5

Ejemplo VIII

Composición de un suplemento alimenticio completo

- 10 La tabla 4 presenta una lista de materiales para la fabricación de 1000 kg de un sustituto alimenticio líquido típico con sabor a vainilla. A continuación, se incluye una descripción detallada de su fabricación.

Tabla 4: lista de materiales para un producto alimenticio líquido con sabor a vainilla

Ingrediente	Cantidad por 1000 kg
Agua	CS
Jarabe de maíz	33 kg
Maltodextrina	28 kg
Sacarosa	19,4 kg
Caseinato	8,7 kg
Monohidrato de calcio de HMB	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 sérica	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 gm
Lecitina	658 gm
Cloruro de magnesio	558 gm
Aroma de vainilla	544 gm
Cloruro sódico	272 gm
Carragenina	227 gm
Cloruro de colina	218 gm
Premezcla UTM/TM	165 gm
Cloruro potásico	146 gm
Ácido ascórbico	145 gm
Citrato de sodio	119 gm
Hidróxido de potasio	104 gm
Luteína (5 %)	46 gm
Premezcla de vitaminas solubles en agua	33 gm
Premezcla de vitaminas DEK	29 gm
Vitamina A	3,7 gm
Yoduro de potasio	86 mcg
Premezcla vitaminas solubles en agua (por g de premezcla): 375 mg/g de niacinamida, 242 mg/g de pantotenato de calcio, 8,4 g de ácido fólico, 62 mg/g de cloruro de tiamina, 48,4 gm/g de riboflavina, 59,6 mg/g de clorhidrato de piridoxina, 165 mcg/g de cianocobalamina y 7305 mcg/g de biotina	
Premezcla de vitaminas DEK (por g de premezcla): 8130 IU/g de vitamina D3, 838 IU/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 zinc, 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 de molibdeno	

- 15 Los productos sustitutivos alimenticios líquidos descritos en el presente documento se fabrican preparando tres suspensiones que se mezclan entre sí, se tratan térmicamente, se estandarizan, se envasan y se esterilizan.

Se prepara una suspensión de hidratos de carbono/minerales calentando primero la cantidad requerida de agua a una temperatura de entre aproximadamente 65 °C y aproximadamente 71 °C con agitación. Se agrega la cantidad requerida de HMB de calcio y se agita durante un mínimo de 5 minutos. Con agitación, se agrega la cantidad requerida de citrato de potasio y de premezcla de minerales ultratraza/traza (UTM/TM) (distribuida por Fortitech, 5 Schenectady, Nueva York, EE. UU.). La suspensión es de color amarillo verdoso. Se mantiene la agitación hasta que los minerales se dispersen por completo. Con agitación, se agregan las cantidades requeridas de los siguientes minerales: cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cloruro sódico, citrato de sodio, yoduro de potasio, fosfato de magnesio y fosfato tricálcico. A continuación, se agregan la maltodextrina distribuida por Grain Processing Corporation, Muscatine, Iowa, EE. UU., la sacarosa y el jarabe de maíz a la suspensión con alta agitación y se deja 10 que se disuelvan. La suspensión de hidratos de carbono/minerales terminada se mantiene, con agitación, a una temperatura de entre aproximadamente 65 °C y aproximadamente 71 °C durante no más de ocho horas hasta que se mezcle con las otras suspensiones.

Se prepara una suspensión de proteína en grasa (PEA) combinando y calentando las cantidades requeridas de 15 aceite de cártamo de alto contenido oleico y aceite de canola a una temperatura de entre aproximadamente 40,5 °C y aproximadamente 49 °C con agitación. Con agitación, se agregan las cantidades requeridas de luteína libre de Kemin Foods en Des Moines, Iowa, EE. UU. Se agita durante un mínimo de 15 minutos. Se agregan al aceite caliente los siguientes ingredientes: lecitina (distribuida por Central Soya Company, Fort Wayne, Indiana, EE. UU.), vitamina A y premezcla de vitaminas D, E y K (distribuida por Vitamins Inc., Chicago, Illinois, EE. UU.). La cantidad 20 requerida de carragenina se mezcla en seco con la cantidad requerida de proteína sérica, se agrega a la mezcla de lípidos sometida a agitación y se deja agitar durante un mínimo de 10 minutos. Se agrega a la mezcla la cantidad requerida de proteína de soja y se mezcla lentamente para garantizar una mezcla adecuada. La suspensión de aceite/proteína terminada se mantiene, con agitación moderada, a una temperatura de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 43 °C durante un plazo de no más de dos horas hasta que se mezcle con las otras 25 suspensiones.

Se prepara una suspensión de proteína en agua calentando primero aproximadamente la cantidad de agua requerida a una temperatura de aproximadamente 40 °C con agitación. Se agrega el caseinato y la solución se agita bien hasta que el caseinato se disperse por completo. Con agitación continua, se calienta lentamente la solución a 30 entre 60 °C y 65 °C. La suspensión se mantiene durante no más de doce horas hasta que se mezcle con las otras suspensiones.

El lote se ensambla mezclando la cantidad requerida de suspensión de proteínas con la cantidad requerida de suspensión de hidratos de carbono/minerales y se dejan agitar durante 10 minutos. Con agitación, se agrega la 35 cantidad requerida de suspensión de aceite/proteína y se agita durante al menos 10 minutos. El pH del lote mezclado se ajusta a un pH de entre 6,66 y 6,75 con hidróxido de potasio 1N.

Tras esperar durante un plazo de no menos de un minuto ni de más de dos horas, la suspensión mezclada se somete a desaireación, tratamiento a temperaturas ultra altas y homogeneización. La suspensión mezclada se 40 calienta a una temperatura de entre aproximadamente 71 °C y aproximadamente 82 °C y se desairea al vacío. A continuación, la suspensión calentada se emulsiona mediante un homogeneizador de una sola etapa a entre 900 y 1100 psig. Tras la emulsificación, la suspensión se calienta a entre aproximadamente 99 °C y aproximadamente 110 °C y a continuación, se calienta a una temperatura de aproximadamente 146 °C durante aproximadamente 5 segundos. Se hace pasar la suspensión a través de un enfriador instantáneo para reducir la temperatura de entre 45 aproximadamente 99 °C y aproximadamente 110 °C y a continuación, a través de un intercambiador de calor de placas para reducir la temperatura de entre aproximadamente 71 °C y aproximadamente 76 °C. A continuación, la suspensión se homogeniza a entre 3900 y 4100 / entre 400 y 600 psig. La suspensión se mantiene a entre aproximadamente 74 °C y aproximadamente 80 °C durante 16 segundos y a continuación, se enfría a entre 1 °C y 50 aproximadamente 7 °C. En este punto, se toman muestras para realizar pruebas microbiológicas y analíticas. La mezcla se mantiene con agitación.

Se prepara por separado una solución de vitaminas solubles en agua (VSA) y se agrega a la suspensión mezclada procesada.

55 La solución vitamínica se prepara añadiendo los siguientes ingredientes a 9,4 kg de agua con agitación: Premezcla de vitaminas solubles en agua (distribuida por J.B. Laboratories, Holland, Michigan, EE. UU.), vitamina C, cloruro de colina, L-carnitina, taurina, inositol, ácido fólico, clorhidrato de piridoxina y cianocobalamina. Se agrega la cantidad requerida de suspensión de hidróxido de potasio al 45 % se añade para ajustar el pH a entre 7 y 10.

60 Basándose en los resultados analíticos de las pruebas de control de calidad, se agrega una cantidad adecuada de

agua al lote con agitación para conseguir los sólidos totales deseados. Además, se añaden 8,8 kg de solución vitamínica al lote diluido con agitación.

El pH del producto puede ajustarse para conseguir una estabilidad óptima del producto. El producto terminado se coloca en recipientes adecuados y se somete a esterilización terminal.

Ejemplo IX

Composición de una bebida

Para fabricar un lote de 1000 kg de una bebida lista para su consumo, se introducen 987,31 kg de agua en un recipiente equipado con un agitador. A temperatura ambiente, se agrega la cantidad requerida de benzoato de potasio y se deja que se disuelva completamente. Se agrega la cantidad requerida de HMB y se deja que se disuelva por completo. A continuación, se agregan los siguientes ingredientes en el orden especificado. Cada ingrediente se disuelve por completo antes de añadir el siguiente ingrediente.

Tabla 5: bebida lista para su consumo

Benzoato de potasio	0,30	kg
Monohidrato de calcio de HMB	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 potasio	6,06	kg
Colorantes	0,0019	kg
Aromas naturales y artificiales	1,00	kg
Ácido ascórbico	0,33	kg

El ácido ascórbico se agregó justo antes de verter la bebida en latas de aluminio de 355 ml (12 onzas). Las bebidas pueden carbonatarse antes de introducirlas en latas de aluminio. La solución se desairea y a continuación, se transfiere a un carbonatador donde se enfría y carbonata a aproximadamente 2,5 volúmenes de dióxido de carbono.

Ejemplo X

Composición de un producto de sustitución de electrolitos

El siguiente ejemplo explica cómo fabricar una solución de rehidratación lista para su consumo. La solución de rehidratación presenta la composición que se expresa en la tabla 6.

TABLA 6: solución de rehidratación lista para su consumo

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

- Pese la cantidad requerida de agua filtrada y añádela al recipiente de mezcla. Caliente el agua a entre 43 y 54 °C, con agitación moderada. Manteniendo la agitación moderada, agregue el HMB de calcio y deje que se mezcle durante un mínimo de 5 minutos. Con agitación moderada continua, agregue la cantidad requerida de dextrosa. Agite hasta que se disuelva. Agregue la cantidad requerida de fructosa. Agite hasta que se disuelva. Agregue, en el orden indicado, las cantidades requeridas de los siguientes ingredientes a la mezcla de dextrosa/fructosa y agite hasta que se disuelvan: gluconato de zinc, citrato sódico, cloruro sódico, citrato de potasio y ácido cítrico. Agregue la cantidad requerida de sacarosa (distribuida por McNeil Speciality Products Company en New Brunswick, Nueva Jersey, EE. UU.) y de acesulfamo de potasio (distribuido como Sunsett® por Hoechst Food Ingredients en Somerset, Nueva Jersey, EE. UU.) y agite hasta que se disuelvan. Agregue el amarillo N.º 6 y el aroma de ponche de frutas al lote hasta que se disuelvan. Enfríe la mezcla a entre 1,1y 7,2 °C y manténgala con agitación baja. Llene el número requerido de botellas de plástico de un litro, aplique el sello térmico de aluminio a la boca de la botella y aplique los estándares de esterilidad de calidad alimentaria.
- Alternativamente, la mezcla enfriada se encapsula dentro de un material de envasado precintable y compatible con la congelación y se sella, por ejemplo, mediante sellado térmico. Una dosis individual de solución de rehidratación se envasa en una bolsa herméticamente sellada compatible con la congelación. Diversos tipos de materiales de envasado, como el que se usa para los tradicionales polos flash golosina, resultarían evidentes a los artesanos expertos. El material de envoltura es preferiblemente de un tipo que permita colocar marcas, por ejemplo la identificación del producto, los ingredientes que contiene, etc. en la superficie externa del mismo. La fórmula de rehidratación se envía y almacena, preferiblemente en lotes de varias unidades, en estas condiciones. Se contempla que se envasen varias unidades de polos flash golosina juntas para su comercialización.
- Antes de la administración, se congela un envase de solución de rehidratación líquida. Después de la congelación, se abre el envase y se consume el contenido del mismo. Dado que, generalmente, la formulación de rehidratación congelada se administrará a temperatura ambiente, la cantidad de líquido de rehidratación contenida en cada envase es preferiblemente una cantidad que pueda consumirse en su totalidad sin que llegue a descongelarse. Preferiblemente, entre 5,9 l y 1,03 l (entre 20 y 35 onzas), más preferiblemente entre 0,059 l y 0,073 l (entre 2,0 y 2,5 onzas) por envase. En una realización particularmente preferida, se encapsulan 0,062 l (2,1 onzas) de solución de rehidratación estéril en un material de envoltura compatible con la congelación de forma rectangular, p. ej., de 2,45 cm por 20,32 cm (1 por 8 pulgadas). Se prefiere un material de envoltura de plástico transparente.

REIVINDICACIONES

1. Uso del ácido beta-hidroxi-beta-metilbútrico (HMB) o sus sales para fabricar un medicamento para la prevención o tratamiento de la enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) en pacientes mediante la regulación negativa de la expresión y/o la actividad de componentes seleccionados de entre el grupo que comprende proteína quinasa C, factor nuclear kappa B, enzimas conjugadoras de ubiquitina y componentes del proteasoma 26S.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde al menos uno de los componentes seleccionados de entre el grupo que comprende L-carnitina, una fuente de nitrógeno amino enriquecida con aminoácidos neutros de gran tamaño que carece sustancialmente de aminoácidos libres, ácidos grasos omega 3 y oligosacáridos indigeribles se administra en combinación con HMB o sales del mismo.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde los ácidos grasos omega 3 comprenden ácido eicosapentaenoico.
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el HMB es una sal de calcio de HMB.

Eventos intracelulares potenciales en el músculo esquelético implicados en la activación proteasómica inducida por PEG

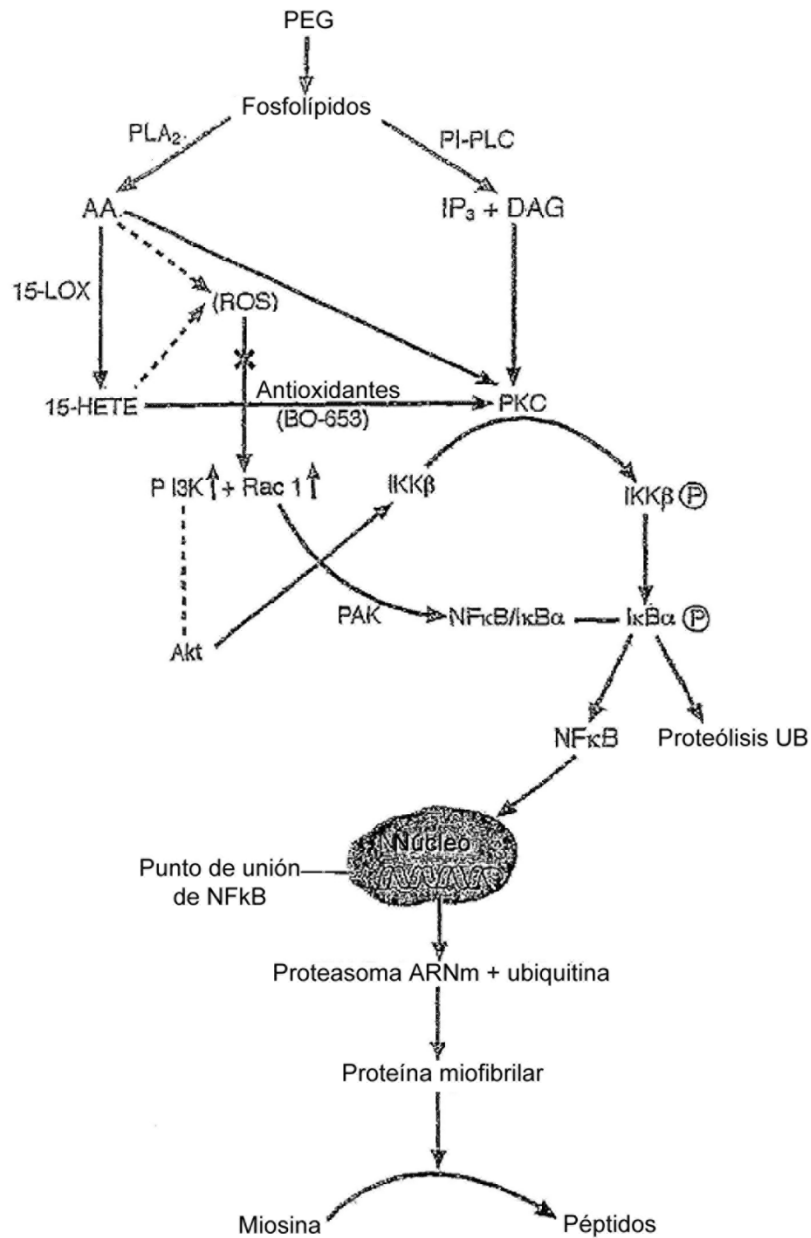


Figura 1

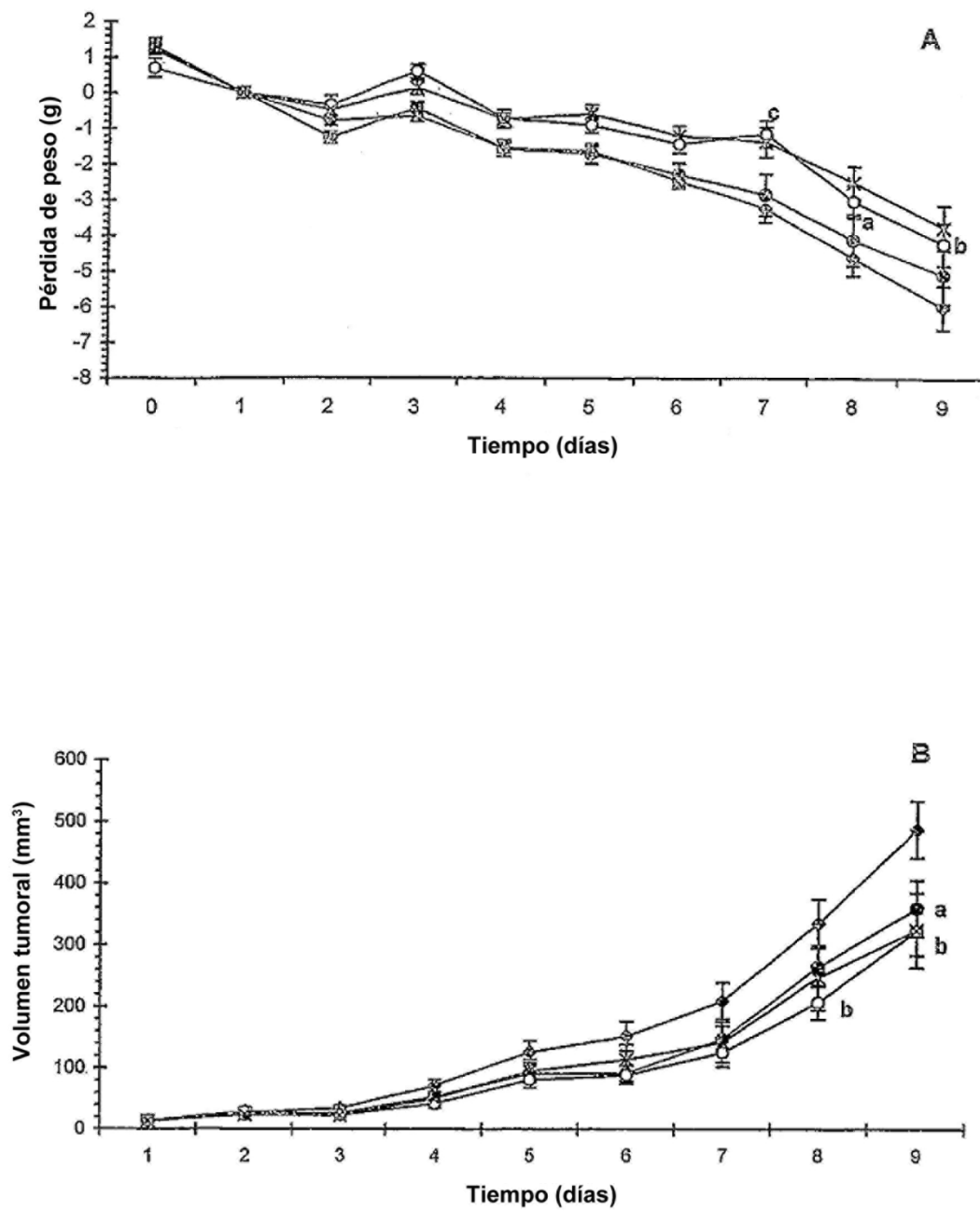


Figura 2

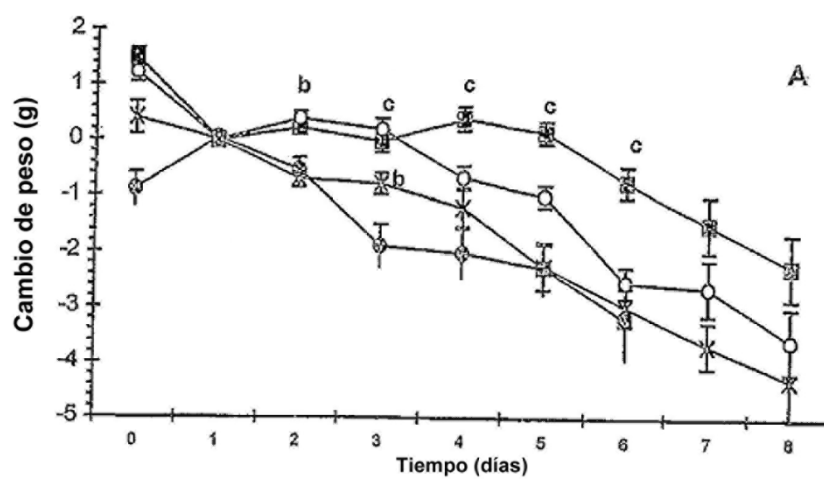


Figura 3

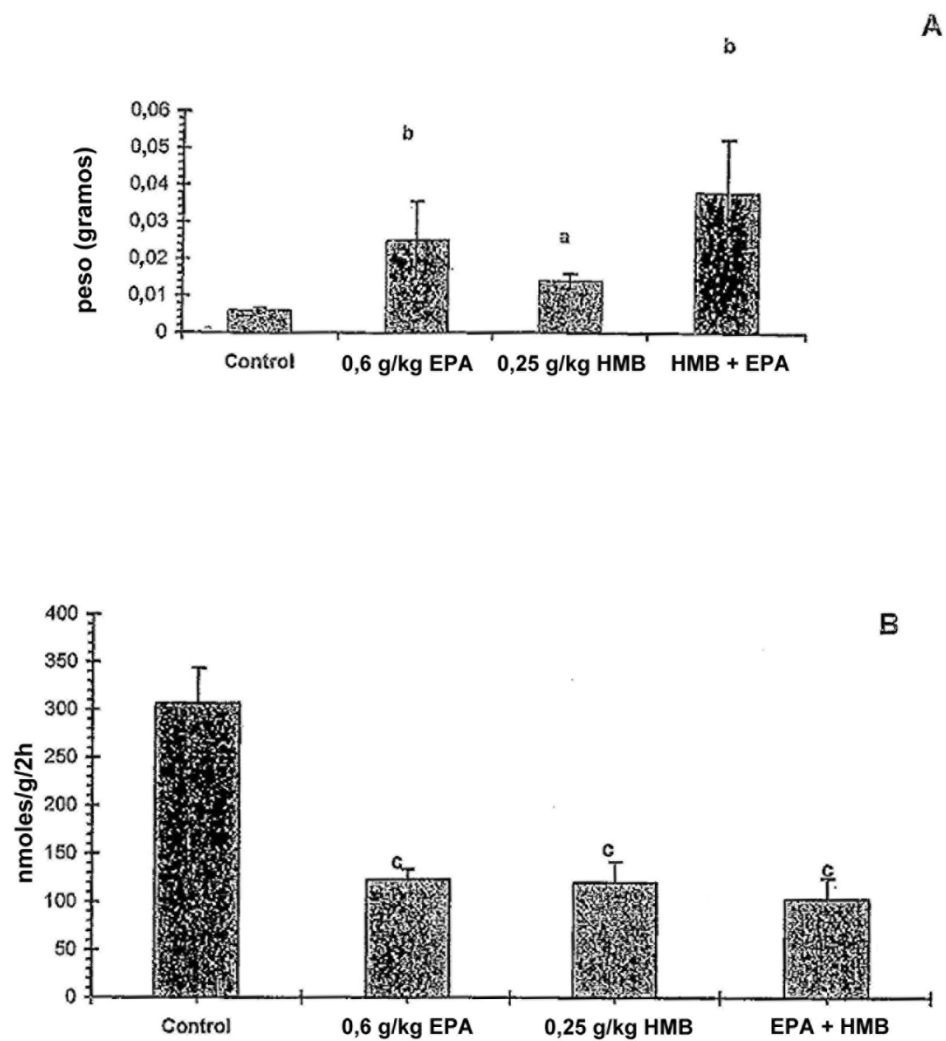


Figura 4

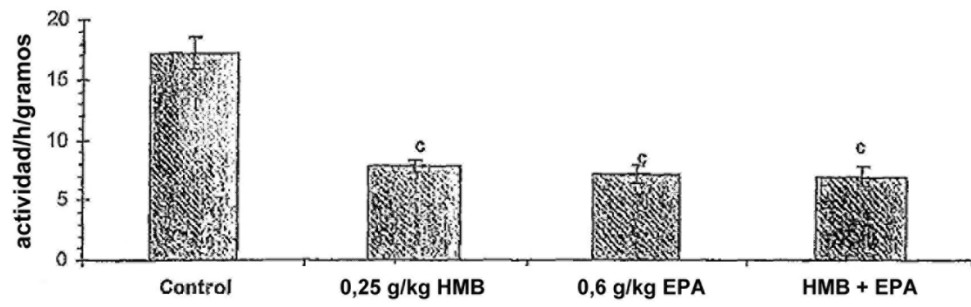


Figura 5

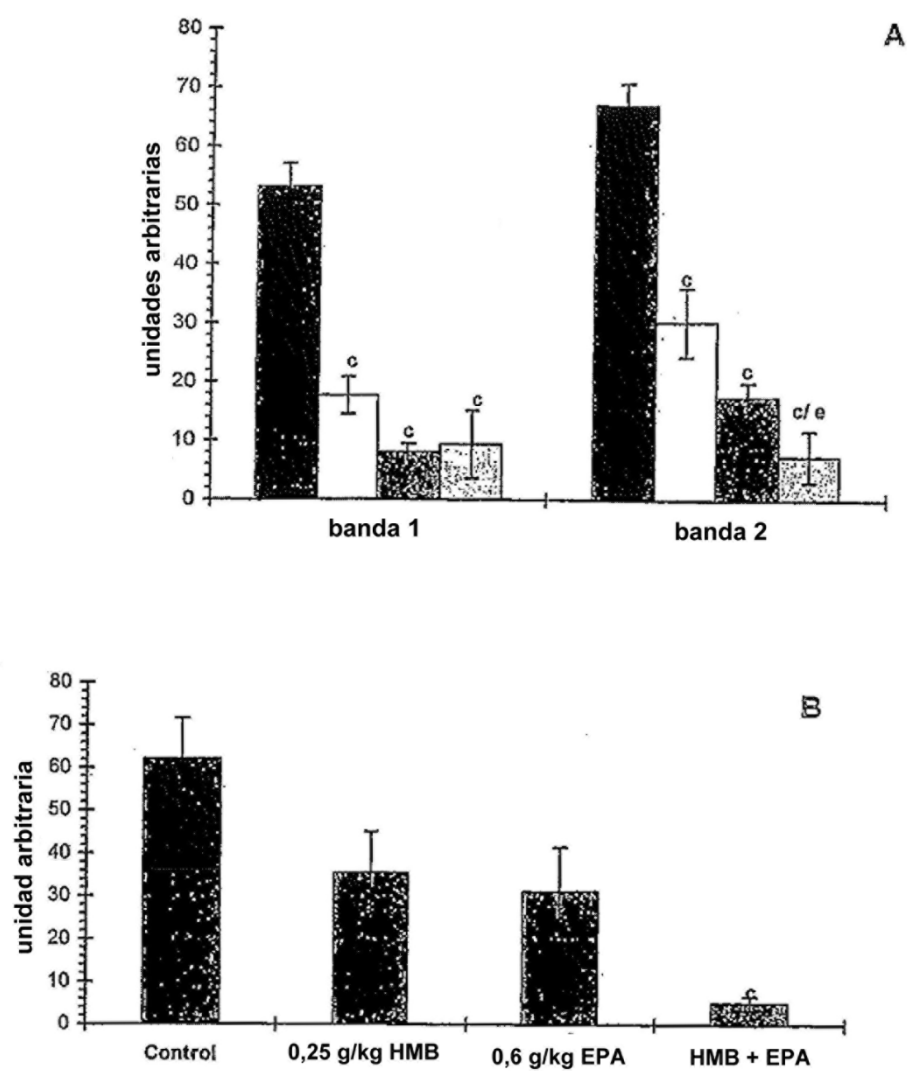


Figura 6

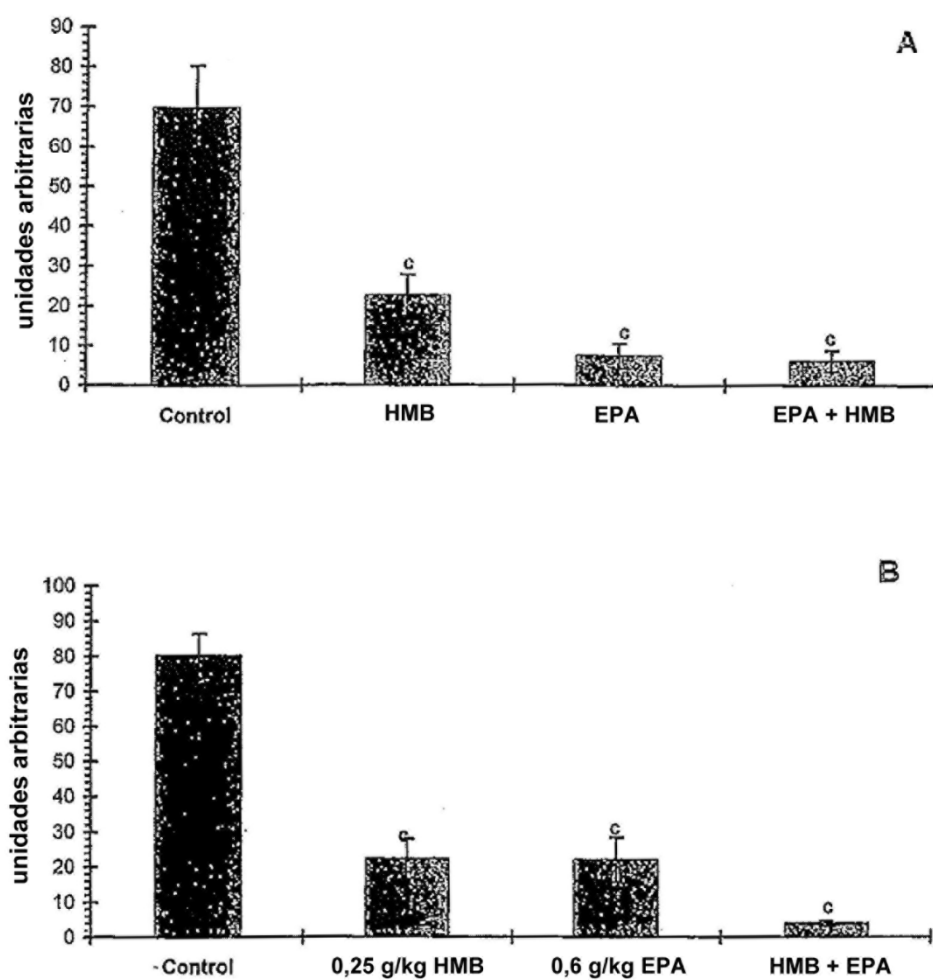


Figura 7

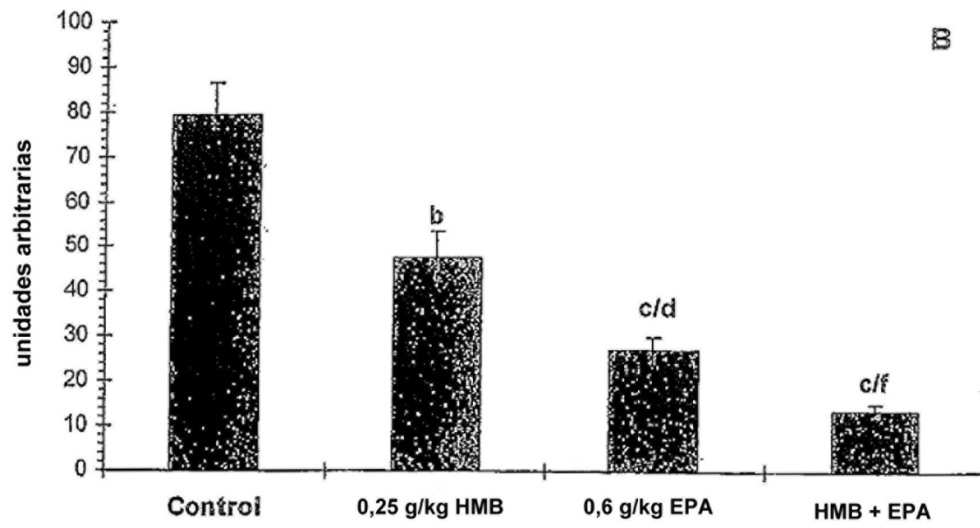


Figura 8

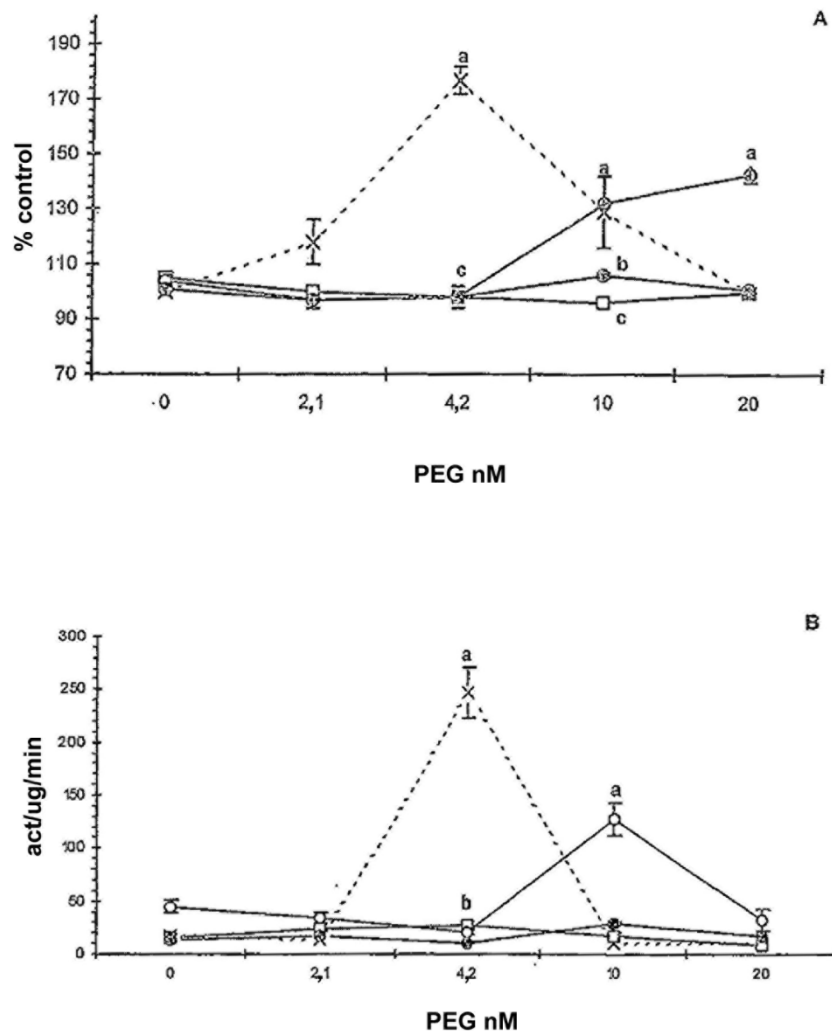


Figura 9

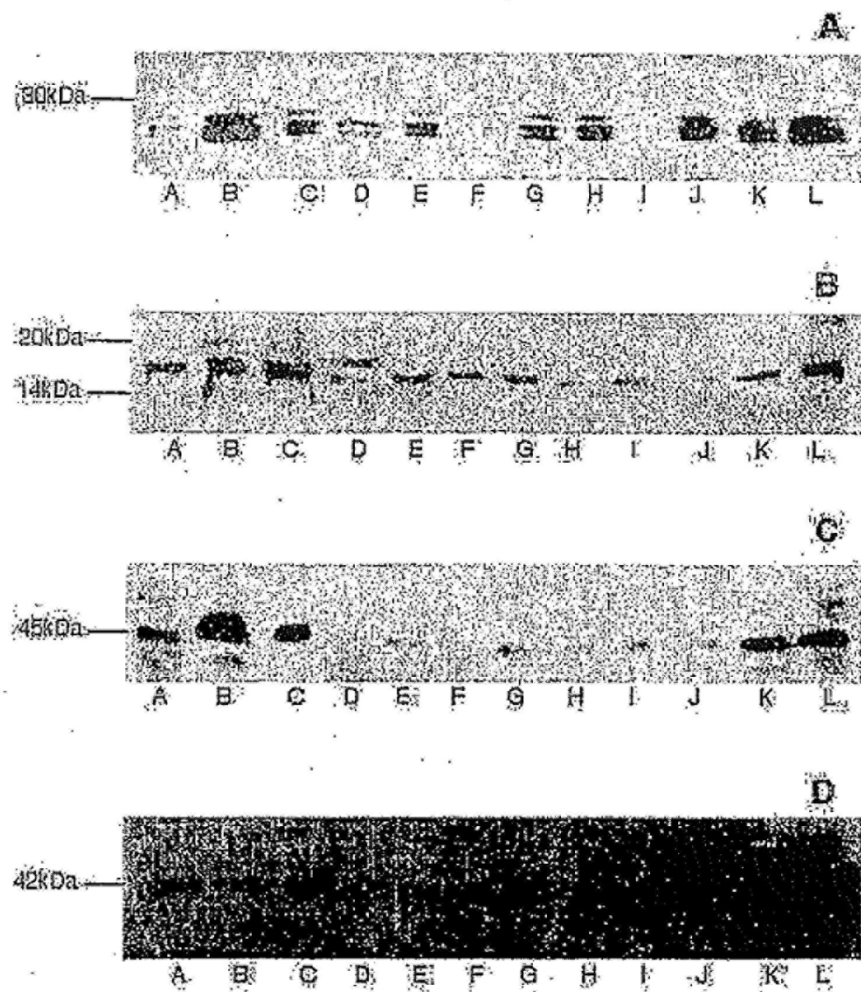


Figura 10

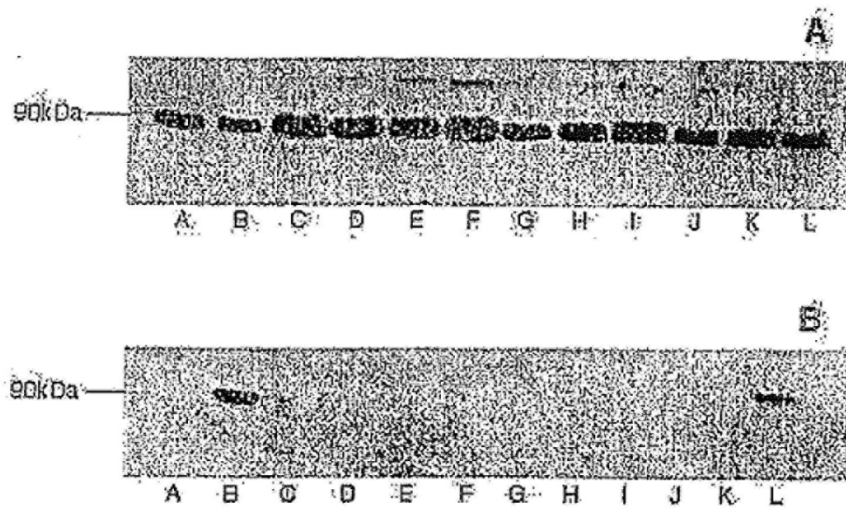


Figura 11

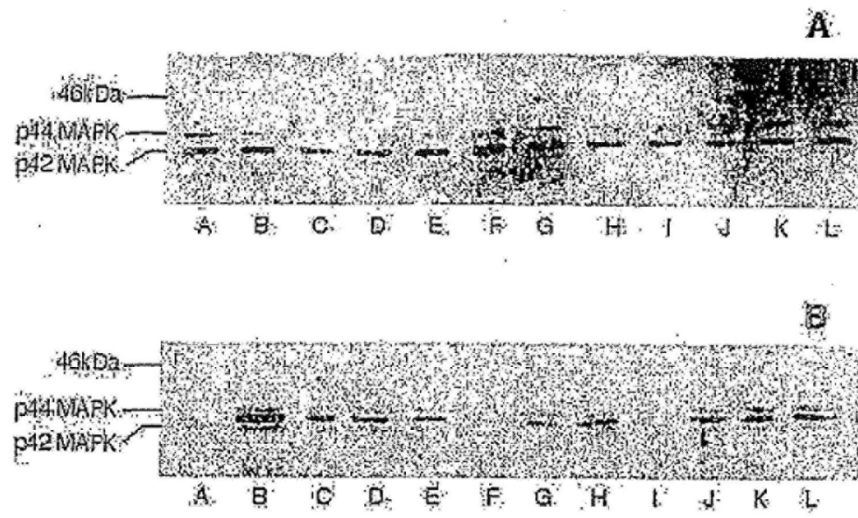


Figura 12

Figura 13

