(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 811 759**

(51) Int. CI.:

A61K 35/20	(2006.01)	***A61P 21/06***	(2006.01)
A61P 1/14	(2006.01)	*A23C 9/142*	(2006.01)
A23J 1/20	(2006.01)	*A23C 9/146*	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)		
A61P 1/00	(2006.01)		
A61P 3/00	(2006.01)		
A61P 3/02	(2006.01)		
A61P 3/04	(2006.01)		
A61P 3/08	(2006.01)		
A61P 7/00	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2013 PCT/NZ2013/000035**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13133727**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2013 E 13757439 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 2822568**

(54) Título: **Usos de composiciones de caseína**

(30) Prioridad:

09.03.2012 US 201261608858 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.03.2021

(73) Titular/es:

FONTERRA CO-OPERATIVE GROUP LIMITED (100.0%)
109 Fanshawe Street
Auckland Central Auckland 1010, NZ

(72) Inventor/es:

FANNING, AARON CALVIN;
PATEL, HASMUKH AMBALAL;
SCHALK, JOHANNES;
HALL, RAMON STAFFORD;
SCHWARZENBACH, ROGER RICHARD y
UKRAINTSEV, SERGEY YEVGENIEVICH

(74) Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

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

Usos de composiciones de caseína

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición de caseína para aumentar la velocidad de vaciado gástrico después de la ingestión de la composición, aumentar la digestibilidad de una composición proteica, o aumentar la velocidad de suministro de aminoácidos a la sangre, o para aumentar la concentración sanguínea de leucina libre en un sujeto, preferentemente hasta sustancialmente el mismo nivel que la proteína en suero de leche, estando la caseína de 10 a aproximadamente 100 % disminuida en calcio, con un grado de hidrólisis inferior a aproximadamente 1 % y un patrón de fosforilación no modificado.

Antecedentes de la invención

El músculo esquelético contiene 50-75 % de todas las proteínas en el cuerpo humano. El agotamiento sustancial del músculo esquelético, asociado con el envejecimiento (por ejemplo, la sarcopenia relacionada con la edad), diversos estados de enfermedad (por ejemplo, caquexia y anorexia) o después de una cirugía o la realización de deportes, pueden aumentar tanto la morbilidad como la mortalidad. La sarcopenia relacionada con la edad es una afección que se caracteriza por la pérdida progresiva y generalizada de la masa y fuerza del músculo esquelético. Esto conlleva a un mayor riesgo de resultados adversos como la discapacidad física, una mala calidad de vida y la muerte. La caquexia se define como desgaste muscular severo y es un síndrome metabólico complejo asociado con una enfermedad subyacente. Se caracteriza por una pérdida de masa muscular, con o sin pérdida de grasa (Cruz-Jentoft AJ, Baeyen JP, Bauer JM y otros Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. Age and ageing 2010; 39:412-423).

Los ancianos o los que padecen enfermedades requieren un aumento de proteínas en su dieta a un nivel mayor que el que necesitan las personas más jóvenes y saludables. Varios estudios informan que la ingestión adicional de proteínas puede mejorar la masa muscular, la fuerza y la función en los ancianos. Además, otros factores, como el estado inmunitario, la cicatrización de heridas, la presión arterial y la salud ósea pueden mejorarse al aumentar la ingestión de proteínas. (Wolf RR y otros, Optimal protein intake in the elderly. Clin Nutr. 2008; 5:675-684).

Los aminoácidos esenciales (EAA) son los principales responsables de la regulación de la síntesis de proteínas musculares, y de los EAA, se reconoce que la leucina tiene un papel particular en la estimulación de la síntesis de proteínas musculares (Garlick PJ. The role of leucine in the regulation of protein metabolism. J Nutr 2005; 135:1553S-1556S).

Las fuentes de leucina incluyen carne, nueces, frijoles, arroz integral, trigo y lácteos. La caseína láctea contiene altos niveles de leucina, isoleucina y valina, aunque la proteína de suero contiene niveles más altos de leucina y de aminoácidos esenciales totales (Fox PF, editores McSweeney PLH, Advanced Dairy Chemistry, Volumen 1 - Proteins, 3ra Edición, editorial Kluwer Academic/Plenum, NY, 2003). Se informó que la caseína es menos efectiva que el suero para aumentar la concentración de aminoácidos esenciales, incluyendo la leucina, en la sangre (Boirie, Y. y otros, Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. Proc. Natl. Acad. Sci. 1997; 94(26):14930-14935).

Los siguientes documentos técnicos se consideran relevantes para el campo tecnológico de la presente invención: Jose A. L. Calbet y otros: "Gastric emptying, gastric secretion and enterogastrone response after administration of milk proteins or their peptide hydrolysates in humans", EUROPEAN JOURNAL OF NUTRITION, vol. 43, núm. 3, 1 de junio 2004 (2004-06-01), páginas 127-139; M Fox y otros: "Dietary protein precipitation properties have effects on gastric emptying in healthy volunteers", CLINICAL NUTRITION., vol 23, núm. 4, 1 de agosto 2004 (2004-08-01), páginas 641-646; K. Van Norren: "Dose-dependent effects of leucine supplementation on preservation of muscle mass in cancer cachectic mice", Oncology Reports, 18 de abril 2011 (2011-04-18); Layne E Norton y otros: "Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise", The Journal of Nutrition, 1 de febrero 2006 (2006-02-01), páginas 533S-537S; and Isabelle Rieu y otros: "Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia: Leucine and protein metabolism in the elderly", The Journal of Physiology, vol. 575, núm. 1, 8 de agosto 2006 (2006-08-08), páginas 305-315.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un método mejorado o alternativo para aumentar la velocidad de vaciado gástrico después de la ingestión de una composición de caseína, aumentar la digestibilidad de una composición de proteína, aumentar la velocidad de suministro de aminoácidos a la sangre o aumentar la concentración de leucina en suero en un sujeto, o al menos proporcionar al público una opción útil.

Resumen de la invención

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención se refiere al uso de una composición de caseína para aumentar la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo en un sujeto, en donde la composición de caseína comprende

o la caseína está en forma de un concentrado o aislado de proteína de leche disminuido en calcio (MPC o MPI), la caseína está de 10 % a 100 % disminuida en calcio, tiene un grado de hidrólisis inferior al 1 % y un patrón de fosforilación no modificado; y en donde el uso no tiene el propósito de llevar a cabo una terapia en el cuerpo de un humano o animal, y preferentemente es capaz de aumentar la concentración de leucina libre en suero sanguíneo en un sujeto a sustancialmente el mismo nivel que la proteína de suero en aproximadamente 15 a aproximadamente 60 minutos después de la administración.

El grado de hidrólisis puede determinarse utilizando métodos que incluyen, pero no se limitan a, HPLC, SDS PAGE y métodos basados en reactivos como el método de o-ftalaldehído (OPA). En el método OPA, un reactivo tiol, como OPA, etanodiol o ditiotreitol, o derivados de los mismos, reacciona con la caseína, lo que conlleva a la unión del reactivo tiol a aminoácidos específicos dentro de la proteína hidrolizada. Los aminoácidos unidos a tiol emiten fluorescencia fuertemente a 450 nm y el nivel de fluorescencia se usa como una medida cuantitativa del grado de hidrólisis.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una composición de caseína para aumentar la velocidad de vaciado gástrico después de la ingestión de la composición, aumentar la digestibilidad de una composición proteica o aumentar la velocidad de suministro de aminoácidos a la sangre, en donde la caseína la composición comprende o la caseína está en forma de un concentrado o aislado de proteína de leche disminuido en calcio (MPC o MPI), la caseína está de 10 a 100 % disminuida en calcio, tiene un grado de hidrólisis inferior al 1 % y tiene un patrón de fosforilación no modificado; y en donde el uso no tiene el propósito de llevar a cabo una terapia en el cuerpo humano o animal.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición de caseína para su uso en a) prevenir o tratar la caquexia en un sujeto, b) prevenir o tratar la sarcopenia en un sujeto, c) aumentar la velocidad de recuperación de un sujeto después de la cirugía, o d) aumentar la velocidad de recuperación de un sujeto después de una lesión, aumentando la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo en el sujeto; en donde la caseína está de 10 a 100 % disminuida en calcio, tiene un grado de hidrólisis inferior al 1 % y un patrón de fosforilación no modificado; y en donde la composición de caseína comprende o la caseína está en forma de un concentrado o aislado de proteína de leche disminuido en calcio (MPC o MPI).

Cualquiera de las siguientes modalidades, solas o en cualquier combinación de dos o más de las siguientes modalidades, puede referirse a cualquiera de los aspectos anteriores.

En una modalidad, la caseína está en forma no hidrolizada y tiene un patrón de fosforilación no modificado o es kappa-caseína no hidrolizada y tiene un patrón de fosforilación no modificado.

En una modalidad, la caseína aumenta la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo en un sujeto, preferentemente a sustancialmente el mismo nivel que la proteína de suero, en los aproximadamente 15, 30, 45 o 60 minutos después de la administración, incluyendo dentro de aproximadamente 15 a aproximadamente 60, aproximadamente 30 a aproximadamente 60 o aproximadamente 45 a aproximadamente 60 minutos. En esta y otras modalidades relacionadas, la proteína de suero puede ser un concentrado de proteína de suero (WPC), preferentemente un concentrado de proteína de suero que comprende aproximadamente 80 % o aproximadamente 85 % de proteína en peso.

En una modalidad, la caseína puede aumentar la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo a al menos aproximadamente 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395 o 400 µmol/L o más, y se pueden seleccionar intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 205 a aproximadamente 255, aproximadamente 210 a aproximadamente 255, aproximadamente 215 a aproximadamente 255, aproximadamente 220 a aproximadamente 255, aproximadamente 225 a aproximadamente 255, aproximadamente 230 a aproximadamente 255, aproximadamente 235 a aproximadamente 255, aproximadamente 240 a aproximadamente 255, aproximadamente 205 a aproximadamente 400, aproximadamente 210 a aproximadamente 400, aproximadamente 215 a aproximadamente 400, aproximadamente 220 a aproximadamente 400, aproximadamente 225 a aproximadamente 400, aproximadamente 230 a aproximadamente 400, aproximadamente 235 a aproximadamente 400, aproximadamente 240 a aproximadamente 400, aproximadamente 245 a aproximadamente 400, aproximadamente 250 a aproximadamente 400, aproximadamente 255 a aproximadamente 400, aproximadamente 260 a aproximadamente 400, aproximadamente 265 a aproximadamente 400, aproximadamente 270 a aproximadamente 400, aproximadamente 275 a aproximadamente 400, aproximadamente 280 a aproximadamente 400, aproximadamente 285 a aproximadamente 400, aproximadamente 290 a aproximadamente 400, aproximadamente 295 a aproximadamente 400, aproximadamente 300 a aproximadamente 400, aproximadamente 305 a aproximadamente 400, aproximadamente 310 a aproximadamente 400, aproximadamente 315 a aproximadamente 400, aproximadamente 320 a aproximadamente 400, aproximadamente 325 a aproximadamente 400, aproximadamente 330 a aproximadamente 400, aproximadamente 335 a aproximadamente 400, aproximadamente 340 a aproximadamente 400, aproximadamente 345 a aproximadamente 400 y aproximadamente 350 a aproximadamente 400 µmol/L).

En otra modalidad, la caseína puede aumentar la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo a al menos

aproximadamente 205 µmol/L, como se describió anteriormente, en al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 minutos o más después de la administración, y se pueden seleccionar intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 5 a aproximadamente 50, aproximadamente 10 a aproximadamente 50, aproximadamente 15 a aproximadamente 50, aproximadamente 20 a aproximadamente 50, aproximadamente 25 a aproximadamente 50, y aproximadamente 30 a aproximadamente 50 minutos).

En una modalidad, la caseína puede aumentar la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo en al menos aproximadamente 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250 o 255 % o más, y se pueden seleccionar intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 100 a aproximadamente 255, aproximadamente 105 a aproximadamente 255, aproximadamente 110 a aproximadamente 255, aproximadamente 115 a aproximadamente 255, aproximadamente 120 a aproximadamente 255, aproximadamente 125 a aproximadamente 255, aproximadamente 130 a aproximadamente 255, aproximadamente 135 a aproximadamente 255, aproximadamente 140 a aproximadamente 255, aproximadamente 145 a aproximadamente 255, aproximadamente 150 a aproximadamente 255, aproximadamente 155 a aproximadamente 255, aproximadamente 160 a aproximadamente 255, aproximadamente 165 a aproximadamente 255, aproximadamente 170 a aproximadamente 255, aproximadamente 175 a aproximadamente 255, aproximadamente 180 a aproximadamente 255, aproximadamente 185 a aproximadamente 255, aproximadamente 190 a aproximadamente 255, aproximadamente 195 a aproximadamente 255, aproximadamente 200 a aproximadamente 255, aproximadamente 205 a aproximadamente 255, aproximadamente 210 a aproximadamente 255, aproximadamente 215 a aproximadamente 255, aproximadamente 220 a aproximadamente 255, aproximadamente 225 a aproximadamente 255, aproximadamente 230 a aproximadamente 255, aproximadamente 235 a aproximadamente 255 y aproximadamente 240 a aproximadamente 255 %).

En otra modalidad, la caseína puede aumentar la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo en al menos aproximadamente 100 a al menos aproximadamente 205 % o más, como se describió anteriormente, en al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 minutos o más después de la administración, y se pueden seleccionar intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 5 a aproximadamente 50, aproximadamente 10 a aproximadamente 50, aproximadamente 15 a aproximadamente 50, aproximadamente 20 a aproximadamente 50, aproximadamente 25 a aproximadamente 50 y aproximadamente 30 a aproximadamente 50 minutos).

En una modalidad, la caseína puede aumentar la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo en al menos aproximadamente 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245 o 250 µmol/L o más, y se pueden seleccionar intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo aproximadamente 100 a aproximadamente 250, aproximadamente 105 a aproximadamente 250, aproximadamente 110 a aproximadamente 250, aproximadamente 115 a aproximadamente 250, aproximadamente 120 a aproximadamente 250, aproximadamente 125 a aproximadamente 250, aproximadamente 130 a aproximadamente 250, aproximadamente 135 a aproximadamente 250, aproximadamente 140 a aproximadamente 250, aproximadamente 145 a aproximadamente 250, aproximadamente 150 a aproximadamente 250, aproximadamente 155 a aproximadamente 250, aproximadamente 160 a aproximadamente 250, aproximadamente 165 a aproximadamente 250, aproximadamente 170 a aproximadamente 250, aproximadamente 175 a aproximadamente 250, aproximadamente 180 a aproximadamente 250, aproximadamente 185 a aproximadamente 250, aproximadamente 190 a aproximadamente 250, aproximadamente 195 a aproximadamente 250, aproximadamente 200 a aproximadamente 250, aproximadamente 205 a aproximadamente 250, aproximadamente 210 a aproximadamente 250, aproximadamente 215 a aproximadamente 250, aproximadamente 220 a aproximadamente 250, aproximadamente 225 a aproximadamente 250, aproximadamente 230 a aproximadamente t 250, aproximadamente 235 a aproximadamente 250, y aproximadamente 240 a aproximadamente 250 µmol/L).

En otra modalidad, la caseína puede aumentar la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo en al menos aproximadamente 105 µmol/L o más, como se describió anteriormente, en al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 minutos o más después de la administración, y se pueden seleccionar intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 5 a aproximadamente 50, aproximadamente 10 a aproximadamente 50, aproximadamente 15 a aproximadamente 50, aproximadamente 20 a aproximadamente 50, aproximadamente 25 a aproximadamente 50 y aproximadamente 30 a aproximadamente 50 minutos).

En diversas modalidades, la caseína permanece soluble a un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, permanece soluble en el tracto gastrointestinal, permanece soluble en fluido gastrointestinal, no forma un coágulo a un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, o no forma un coágulo en el tracto gastrointestinal.

En una modalidad, la caseína está sustancialmente libre de calcio unido.

En una modalidad, la caseína comprende partículas de caseína de aproximadamente 40, 50, 60, 70, 50, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 o 165 nm de diámetro, y se pueden seleccionar intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 50 a aproximadamente 165, aproximadamente 50 a aproximadamente 100 o

aproximadamente 50 a aproximadamente 70 nm).

En diversas modalidades, la composición de caseína comprende una composición de caseína disminuida en calcio; leche desnatada disminuida en calcio; leche desnatada en polvo disminuida en calcio; leche entera disminuida en calcio; leche entera en polvo disminuida en calcio; caseinato, caseinato de sodio, caseinato de potasio, caseinato de zinc, caseinato de magnesio; un concentrado o aislado de proteína de leche modificado para disociar las micelas de caseína; caseína no micelar; un ingrediente de caseína, como un MPC o MPI, donde al menos una porción del calcio o fosfato o tanto el calcio como el fosfato se remplazaron por sodio, potasio, zinc, magnesio y similares, o una combinación de dos o más de ellos; una caseína soluble en ácido; un caseinato no micelar; micelas de caseína quelada; una caseína modificada con carga; una caseína glicosilada; una caseína modificada para disminuir su capacidad de formar un coágulo a pH ácido, preferentemente a un pH por debajo de pH 5, pH 4 o pH 3; una caseína modificada para acelerar su capacidad de hidrolizarse en el tracto gastrointestinal; un ingrediente de caseína con una relación alterada de caseína a suero; una caseína de ácido láctico; una caseína ácida mineral; una o más fracciones de caseína; una fracción de alfa-caseína; una fracción de beta-caseína; una fracción de kappa-caseína; o cualquier combinación de dos o más de los mismos.

En una modalidad, la composición de caseína disminuida en calcio, tal como un concentrado de proteína de leche disminuido en calcio, aislado de proteína de leche disminuido en calcio o caseinato disminuido en calcio es al menos aproximadamente 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o 100 % libre de calcio, y se pueden seleccionar intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 30 a aproximadamente 100, aproximadamente 40 a aproximadamente 100, aproximadamente 50 a aproximadamente 100, aproximadamente 60 a aproximadamente 100, o aproximadamente 70 a aproximadamente 100 %).

En una modalidad, la composición de caseína disminuida en calcio, tal como un concentrado de proteína de leche disminuido en calcio, aislado de proteína de leche disminuido en calcio o caseinato disminuido en calcio, contiene aproximadamente 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25, 2,5, 2,75 o 3 gramos de calcio por 100 gramos de caseína, y se pueden seleccionar intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 0 aproximadamente 3, aproximadamente 0 a aproximadamente 2,5, aproximadamente 0 a aproximadamente 2, aproximadamente 0 a aproximadamente 1,5, aproximadamente 0 a aproximadamente 1, aproximadamente 0 a aproximadamente 0,8 o aproximadamente 0 a aproximadamente 0,5 g de calcio/100 g de caseína).

En una modalidad, la caseína es estable a un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 5.

En una modalidad, el aumento de la concentración de leucina en el suero sanguíneo da como resultado uno o más de los siguientes, o cualquier combinación de cualquiera de dos o más de los mismos, preferentemente hasta sustancialmente el mismo nivel que la proteína de suero:

a) mantenimiento o aumento de la síntesis de proteínas musculares,
b) mantenimiento o aumento de la masa muscular,
c) prevención o reducción de la pérdida de masa muscular,
d) crecimiento sostenido o aumentado,
e) prevención o disminución del catabolismo muscular,
f) prevención o tratamiento de la caquexia,
g) prevención o tratamiento de la sarcopenia,
h) aumento de la velocidad de resíntesis de glucógeno,
i) modulación de los niveles de azúcar en la sangre,
j) aumento de la respuesta de la insulina a la concentración elevada de glucosa en sangre,
k) aumento de la saciedad,
l) reducción de la llenura,
m) ingestión reducida de alimentos,
n) ingestión reducida de calorías,
o) metabolismo de glucosa mejorado,
p) aumento de la velocidad de recuperación después de la cirugía,
q) aumento de la velocidad de recuperación después de una lesión,
r) aumento de la velocidad de recuperación después del ejercicio, o
s) mayor desempeño deportivo.

En diversas modalidades, la composición o formulación comprende al menos aproximadamente 0,01, 0,1, 0,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99 % en peso de proteínas y pueden seleccionarse intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 40, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 60, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 70, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 80, o aproximadamente 0,01 a aproximadamente 99 %).

En una modalidad, la proteína es de una fuente animal o vegetal o una combinación de las mismas. En una modalidad, la proteína comprende caseína y una fuente de proteína adicional, tal como proteína animal o proteína vegetal o una combinación de las mismas. Las fuentes adecuadas de proteína animal incluyen carne y proteína de suero. Las fuentes adecuadas de proteína vegetal incluyen cereales, granos, legumbres (tales como guisantes, frijoles, lentejas y proteína de soja), frutas, nueces y proteínas de semillas, o cualquier combinación de dos o más de las mismas.

En diversas modalidades, la composición o formulación comprende al menos aproximadamente 0,01, 0,1, 0,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 79, 81, 85, 90, 95 o 99 % en peso de caseína y pueden seleccionarse intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 40, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 60, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 70, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 80, o aproximadamente 0,01 a aproximadamente 99 %).

En diversas modalidades de una composición o formulación que contiene proteína como se describe anteriormente, la proteína es al menos aproximadamente 0,01, 0,1, 0,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 79, 81, 85, 90, 95 o 99 % en peso de caseína y pueden seleccionarse intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 40, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 60, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 70, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 80, o aproximadamente 0,01 a aproximadamente 99 % de caseína).

En diversas modalidades de una composición o formulación que contiene proteína como se describió anteriormente, la proteína es al menos aproximadamente 0,01, 0,1, 0,5, 5, 10, 15, 20, 25 o 30 % en peso de proteína de suero y se pueden seleccionar intervalos útiles entre cualquier de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 % de proteína de suero).

En diversas modalidades de una composición o formulación que contiene proteína como se describe anteriormente, la proteína es al menos aproximadamente 0,01, 0,1, 0,5, 5, 10, 15, 20, 25 o 30 % en peso de proteína vegetal y se pueden seleccionar intervalos útiles entre cualquier de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 % de proteína vegetal). Las fuentes adecuadas de proteína vegetal incluyen cereales, granos, legumbres (tales como guisantes, frijoles, lentejas y proteína de soja), frutas, nueces y proteínas de semillas, o cualquier combinación de dos o más de las mismas.

En una modalidad, la composición puede comprender adicionalmente una fuente de aminoácidos, precursores de aminoácidos o metabolitos de aminoácidos o cualquier combinación de cualquiera de dos o más de los mismos, preferentemente aminoácidos libres, precursores de aminoácidos o metabolitos de aminoácidos, tales como los seleccionados entre los grupo que comprende alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, aminoácidos esenciales, aminoácidos no esenciales ácidos, aminoácidos de cadena ramificada, precursores de aminoácidos como N-acetil-L-tirosina, metabolitos de aminoácidos como ácido alfa-cetoglutárico y aminoácidos no estándar, y cualquier combinación de dos o más de los mismos. En una modalidad, la composición o formulación comprende al menos aproximadamente 0,01, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 o 15 % en peso o más de aminoácidos libres, aminoácidos, precursores o metabolitos de aminoácidos y pueden seleccionarse intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 o aproximadamente 0,01 a aproximadamente 15 %).

En una modalidad, la composición o formulación comprende al menos aproximadamente 0,01, 0,1, 0,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 % en peso de lípidos y pueden seleccionarse intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 40 o aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 %).

En una modalidad, el lípido es de una fuente animal o vegetal.

En una modalidad, la composición o formulación comprende al menos aproximadamente 0,01, 0,1, 0,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 o 70 % en peso de carbohidratos y se pueden seleccionar intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 40, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 60, o aproximadamente 0,01 a aproximadamente 70 %).

En una modalidad, el carbohidrato se selecciona de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos, y cualquier combinación de dos o más de los mismos.

En una modalidad, la composición o formulación comprende al menos aproximadamente 0,01, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % en peso de minerales o vitaminas y se pueden seleccionar intervalos útiles entre cualquier de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 4, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 6, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 8, o aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 %).

En una modalidad, la composición o formulación comprende de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 95 % de proteína, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 50 % de lípidos, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 70 % de carbohidratos, y de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 10 % de minerales y vitaminas. En una modalidad, la composición o formulación comprende de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 50 % de proteína, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 30 % de lípidos, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 50 % de carbohidratos, y de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 % de minerales y vitaminas. En una modalidad, la composición o formulación comprende de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 15 % de proteína, de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 % de lípidos, de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 30 % de carbohidratos, y de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 % de minerales y vitaminas. En diversas modalidades, la proteína puede comprender aproximadamente 0,01 a aproximadamente 99 % de caseína, como se describió anteriormente.

En una modalidad, la composición o formulación tiene un contenido energético de aproximadamente 1 kcal (4,184 kJ) por 100 ml a aproximadamente 300 kcal (1255 kJ) por 100 ml.

En diversas modalidades, el pH de la composición de formulación es de aproximadamente 1 a aproximadamente 14, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, de aproximadamente 9 a 14, de aproximadamente 1 a aproximadamente 9 o de aproximadamente 5 a aproximadamente 9.

En una modalidad, la composición o formulación comprende además uno o más de jugo de fruta, concentrados de jugo, sabores naturales o artificiales, edulcorantes naturales o artificiales, colorantes naturales o artificiales, fibras, probióticos, prebióticos, hierbas, cafeína, guaraná, glucosamina, aminoácidos libres (como se describió anteriormente), ácidos orgánicos, precursores de aminoácidos, metabolitos de aminoácidos, taurina, ácido alfa-cetoglutárico, N-acetil-L-tirosina, creatina, ésteres de creatina, éster etílico de creatina, sales de creatina, clorhidrato de creatina, beta -alanina, ácido beta-hidroxi beta-metilbutírico y beta-hidroxi beta-metilbuterato, o cualquier combinación de dos o más de los mismos.

En una modalidad, la composición o formulación es una bebida de consumo que comprende de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 % de proteína, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 % de lípidos, de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 15 % de carbohidratos y de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2 % de minerales y vitaminas y tiene un contenido energético de al menos 1 kcal (4,184 kJ) por 100 ml. En una modalidad, la proteína puede comprender aproximadamente 0,01 a aproximadamente 99 % de caseína, como se describió anteriormente.

En una modalidad, la composición o formulación es una bebida de recuperación que comprende adicionalmente uno cualquiera o más de sabores naturales o artificiales, edulcorantes naturales o artificiales, colorantes naturales o artificiales, o glucosamina, o cualquier combinación de dos o más de los mismos. En una modalidad, la bebida de recuperación comprende de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 % de proteína, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 4 % de lípidos, de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 20 % de carbohidratos, y de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2 % de minerales y vitaminas y tiene un contenido energético de al menos 1 kcal (4,184 kJ) por 100 ml. En una modalidad, la proteína puede comprender aproximadamente 0,01 a aproximadamente 99 % de caseína, como se describió anteriormente.

En una modalidad, la composición o formulación es un alimento médico que comprende adicionalmente uno cualquiera o más de sabores naturales o artificiales, edulcorantes naturales o artificiales o colorantes naturales o artificiales, o cualquier combinación de dos o más de los mismos. En una modalidad, el alimento médico comprende de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % de proteína, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % de lípidos, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 % de carbohidratos, y de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 5 % de minerales o vitaminas y tiene un contenido energético de al menos 50 kcal (209 kJ) por 100 ml. En diversas modalidades, el alimento médico es ácido o neutro. En una modalidad, la proteína puede comprender aproximadamente 0,01 a aproximadamente 99 % de caseína, como se describió anteriormente.

En diversas modalidades, la composición o formulación es un ingrediente utilizado en la preparación de un alimento. En una modalidad, la composición o formulación se formula para administración separada, simultánea o secuencial con un alimento. En diversas modalidades, el alimento es un dulce, una barra, un producto de leche, leche, un producto lácteo, una leche en polvo, leche reconstituida, leche fermentada, yogur, yogur para beber, yogur firme, una bebida, un aditivo alimentario, un aditivo para bebidas, un suplemento dietético, un producto nutricional, un producto dietético

o un alimento médico.

En otra modalidad, la composición es o se formula como un alimento, bebida, aditivo alimentario, aditivo para bebidas, suplemento dietético, producto nutricional, producto dietético, alimento médico, producto de alimentación enteral, producto de alimentación parenteral, sustituto de comidas, nutracéutico, medicamento o farmacéutico.

En una modalidad, la proteína de suero es un concentrado de proteína de suero o un aislado de proteína de suero. En otra modalidad, la proteína de suero es un concentrado de proteína de suero o un aislado de proteína de suero que comprende aproximadamente 50, 60, 70, 80 o 90 % en peso de proteína, y se pueden seleccionar intervalos útiles entre estos valores (por ejemplo, aproximadamente 50 a aproximadamente 90 %).

Se pretende que la referencia a un intervalo de números descrito en la presente descripción (por ejemplo, de 1 a 10) también incorpore la referencia a todos los números racionales dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1, 1,1, 2, 3, 3,9, 4, 5, 6, 6,5, 7, 8, 9 y 10) y también cualquier intervalo de números racionales dentro de ese intervalo (por ejemplo, 2 a 8, 1,5 a 5,5 y 3,1 a 4,7) y, por lo tanto, todos los subintervalos de todos los intervalos descritos expresamente en la presente descripción se describen expresamente por la presente. Estos son solo ejemplos de lo que se pretende específicamente y todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerado deben considerarse expresamente expresados en esta solicitud de manera similar.

En esta especificación donde se hace referencia a especificaciones de patentes, otros documentos externos u otras fuentes de información, esto generalmente tiene el propósito de proporcionar un contexto para discutir las características de la invención. A menos que se indique específicamente de cualquier otra manera, la referencia a dichos documentos externos no debe interpretarse como una admisión de que dichos documentos, o tales fuentes de información, en cualquier jurisdicción, son técnica previa o forman parte del conocimiento general común en la técnica.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra el cambio en la concentración absoluta de leucina en suero sanguíneo (µmol/L) hasta 180 minutos después del consumo de (A) un concentrado de proteína de leche disminuida en calcio, (B) un concentrado de proteína de suero de la fabricación de queso cheddar, (C) un concentrado de proteína de leche estándar, y (D) un caseinato de calcio.
La Figura 2 es un gráfico que muestra el área bajo la curva de la Figura 1 para el período de 0 a 180 minutos.
La Figura 3 es un gráfico que muestra el área bajo la curva de la Figura 1 para el período de 0 a 60 minutos.
La Figura 4 es un gráfico que muestra la concentración máxima de leucina de la Figura 1.
La Figura 5 es un gráfico que muestra el cambio en la concentración absoluta de leucina en suero sanguíneo (µmol/L) hasta 90 minutos después del consumo de (A) un concentrado de proteína de suero de la fabricación de queso cheddar, (B) un concentrado de proteína de leche disminuida en calcio, (C) un concentrado de proteína de leche estándar, y (D) un caseinato de sodio.
La Figura 6 es un gráfico que muestra el área bajo la curva de la Figura 5 para el período de 0 a 90 minutos.
La Figura 7 es un gráfico que muestra la concentración máxima de leucina de la Figura 5.
La Figura 8 es un gráfico que muestra la viscosidad (Pa/s) del caseinato de sodio (A), MPC disminuida en calcio (B) o MPC estándar (C) a lo largo del tiempo en un modelo gástrico simulado.

Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores determinaron sorprendentemente que los ingredientes de caseína pueden modificarse para que se comporten como el suero, y por lo tanto, entre otras cosas, suministren leucina efectivamente al torrente sanguíneo a niveles equivalentes al suero. Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso de composiciones de caseína para aumentar la velocidad de vaciado gástrico después de la ingestión de una composición de caseína, aumentar la digestibilidad de una composición proteica, aumentar la velocidad de suministro de aminoácidos a la sangre o aumentar la concentración de leucina en suero sanguíneo, y en particular, la presente invención se refiere al uso de una composición de caseína para aumentar la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo en un sujeto a sustancialmente el mismo nivel que la proteína de suero.

1. Definiciones

La frase " disminuida/o en calcio" se usa en la presente descripción para referirse a una composición de caseína, tal como un concentrado de proteína de leche (MPC), en donde la concentración de calcio unido a caseína se redujo y es menor que la concentración de calcio unido a caseína en la correspondiente composición no disminuida en calcio. Tal composición también puede disminuirse en cationes divalentes y, por lo tanto, tener una menor concentración de cationes divalentes unidos a caseína, por ejemplo, magnesio, que la composición no disminuida correspondiente. Similarmente, la referencia al calcio en la proteína de caseína es una referencia al calcio unido, es decir, al calcio unido por la proteína caseína.

El término "que comprende" como se usa en esta especificación significa "que consiste al menos en parte de". Al interpretar las declaraciones en esta especificación que incluyen ese término, las características, precedidas por ese

término en cada declaración o reivindicación, todas deben estar presentes, pero también pueden estar presentes otras características. Los términos relacionados como "comprende" y "comprendiendo" deben interpretarse de la misma manera.

El término "producto dietético" significa un producto formulado o procesado especialmente para satisfacer requisitos dietéticos particulares que existen debido a una condición física o fisiológica particular y/o enfermedades y trastornos específicos y que se presentan como tales.

Una "cantidad efectiva" es la cantidad requerida para conferir efecto terapéutico. Freireich, y otros, 1966, describen la interrelación de las dosis para animales y humanos (basada en miligramos por metro cuadrado de superficie corporal). (véase Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE (1966) Quantitative comparison of toxicity to anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man. Cancer Chemother Rep 50: 219-244). El área de superficie corporal puede determinarse aproximadamente a partir de la altura y el peso del sujeto. Véase, por ejemplo, Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, Nueva York, 1970, 537. Las dosis efectivas también varían, como reconocen los expertos en la técnica, en dependencia de la vía de administración, el uso de un vehículo y similares.

La frase "aumento de la concentración de leucina en suero sanguíneo" y sus equivalentes y derivados gramaticales, se refiere al mantenimiento y aumento de las concentraciones de leucina en suero sanguíneo, preferentemente a concentraciones fisiológicas adecuadas para estimular al máximo la síntesis de proteínas musculares en el período postprandial. A los efectos de determinar los niveles de leucina en la sangre, las referencias a "sangre", "suero sanguíneo" y "plasma sanguíneo" son intercambiables.

El término "concentrado de proteína de leche" (o MPC) es un producto de proteína de leche en donde más del 55 %, preferentemente más del 75 % de la materia en seco es proteína de leche y la relación de caseína a proteínas de suero es aproximadamente la de la leche. Tales concentrados se conocen en la técnica.

La frase "mantener o aumentar la masa muscular" y sus equivalentes y derivados gramaticales, se refiere a un aumento en la síntesis de proteínas musculares y/o una disminución en la degradación de las proteínas musculares que da como resultado una ganancia o mantenimiento de la masa muscular.

La frase "prevención o reducción de la pérdida de masa muscular" y sus equivalentes y derivados gramaticales, se refiere a la prevención o disminución de la degradación de las proteínas musculares, lo que da como resultado el mantenimiento de la masa muscular o una disminución en la velocidad de pérdida muscular.

Un "sujeto" es un animal, preferentemente un mamífero, con mayor preferencia un animal de compañía mamífero o humano. Los animales de compañía preferidos incluyen gatos, perros y caballos. En una modalidad, el sujeto es un humano. Preferentemente, el humano es un adulto, un niño o un bebé.

La frase "sustancialmente libre de calcio unido" significa que una composición de caseína contiene menos de aproximadamente 0,3, 0,275, 0,25, 0,225, 0,2, 0,175, 0,15, 0,125, 0,1, 0,075, 0,05, 0,025 o 0,01 % en peso de calcio unido a un polipéptido de caseína, y se pueden seleccionar intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,175, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,15, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,125, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 o aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,075 %). El grado de unión de calcio en las micelas de caseína y, por lo tanto, el grado de disminución de calcio de las composiciones de caseína disminuidas en calcio pueden determinarse por métodos conocidos, que incluyen ultrafiltración o ultracentifugación para obtener una fracción de caseína seguido de espectrometría de absorción atómica (véase, por ejemplo, Philippe, M y otros, The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles, Food Chemistry 90 (2005) 673-683, incorporado en la presente descripción por referencia).

El término "tratar" y sus derivados deben interpretarse en su contexto más amplio posible. El término no debe entenderse como que implica que se trata un sujeto hasta su recuperación total. En consecuencia, "tratar" incluye, en términos generales, la mejora y/o prevención de la aparición de los síntomas o la gravedad de una afección particular.

La frase "patrón de fosforilación no modificado" pretende significar que la caseína no es sujeta a desfosforilación. En una modalidad, el patrón de fosforilación no modificado es el patrón de fosforilación natural. Los patrones de fosforilación de los polipéptidos de caseína se informan en la técnica (véase, por ejemplo, Fox PF, editores McSweeney PLH, Advanced Dairy Chemistry, Volumen 1 - Proteins, 3ra edición, Editorial Kluwer Academic/Plenum, NY, 2003, incorporado aquí por referencia). La alfa s1 caseína bovina natural tiene 8 o 9 residuos de fosfato por mol (alfa s1-CN 8P o 9P), la alfa s2 caseína bovina tiene 10, 11, 12 o 13 residuos de fosfato por mol (alfa s2-CN 10P, 11P, 12P, o 13P), la beta caseína bovina tiene 4 o 5 residuos de fosfato por mol (beta-CN 4P o 5P), y la kappa caseína bovina tiene 1, 2 o 3 residuos de fosfato por mol (kappa-CN 1P, 2P o 3P).

2. Caseína

La caseína bovina es el producto de cuatro genes: alfa-s1 (con variantes A, B, C, D, E), alfa-s2 (con variantes A, C,

D), beta (con variantes A1, A2, A3, B, C, D, E, F) y kappa (con variantes A, B, C, E, F, F1). Cada polipéptido de caseína tiene una composición y estructura únicas. En diversas modalidades, la caseína útil en la presente descripción puede ser caseína bovina, camélida, caprina, cervina, equina, ovina o porcina, o cualquier combinación de dos o más de las mismas. Las proteínas de caseína y la producción de composiciones de caseína útiles se analizan ampliamente por Fox & McSweeney, 2003 (Fox PF, editores McSweeney PLH, Advanced Dairy Chemistry, Volumen 1 - Proteins, 3ra edición Editorial Kluwer Academic/Plenum, NY, 2003) y en Dairy Processing Handbook, 2003 (Dairy Processing Handbook, segunda edición, Tetra Pak Processing Systems AB, Suecia, 2003.

La caseína para su uso en cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción incluye caseína en forma de caseína no micelar, caseinato no micelar (que incluye caseinato de sodio y potasio), caseína-ácido láctico, caseína-ácido mineral, α-caseína, β-caseína, kappa-caseína, una fracción de caseína, una fracción de alfa-caseína, una fracción de beta-caseína, una fracción de kappa-caseína, caseína tratada por procesamiento de ultra alta presión (UHP), caseína translúcida o cualquier combinación de dos o más de los mismos.

La caseína útil en la presente descripción tiene un patrón de fosforilación no modificado, como se describió anteriormente. En relación con las alfa-s1 caseínas B, C, D y E bovinas, por ejemplo, la fosforilación postraduccional se produce en los residuos de serina 41, 46, 48, 64, 66, 67, 68 y 115, y en el residuo de treonina 53 en alfa-s1 caseína D. Fox & McSweeney, 2003 informan los patrones de fosforilación de todas las caseínas bovinas.

Las composiciones de caseína disminuidas en calcio pueden prepararse por los métodos descritos en la solicitud PCT internacional publicada WO 2001/041578 y la solicitud PCT internacional publicada WO 2004/057971. Por ejemplo, un método para preparar una composición de caseína disminuida en calcio comprende (a) proporcionar un MPC o MPI que tiene al menos el 70 % de materia en seco como proteína de leche en solución/suspensión acuosa; (b) eliminar del 20 al 100 % de iones calcio mediante un método elegido de al menos uno de (1) intercambio catiónico en un intercambiador de iones en forma de sodio y/o potasio, (2) acidificación a pH<7 con diálisis posterior y/o ultrafiltración y/o diafiltración o (3) mediante la adición de un agente quelante; y/o unir una proporción de iones calcio con un agente quelante; (c) opcionalmente mezclar el producto de la etapa (b) con otra solución de leche mientras se mantiene al menos un 30 % libre de calcio; (d) opcionalmente calentar la solución a una temperatura y durante un tiempo suficiente para permitir la desnaturalización de las proteínas del suero y la interacción con la caseína (por ejemplo, calentar durante 4-15 minutos a > 100 °C), y (e) opcionalmente secar para preparar un producto seco. En una modalidad, la composición de caseína disminuida en calcio es al menos aproximadamente 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o 100 % disminuida en calcio, y se pueden seleccionar intervalos útiles entre cualquiera de estos valores (por ejemplo, aproximadamente 30 a aproximadamente 100 %). El grado de disminución de calcio de las composiciones de caseína libre de calcio se puede determinar mediante métodos conocidos, que incluyen ultrafiltración o ultracentifugación para obtener una fracción de caseína seguido de espectrometría de absorción atómica (véase, por ejemplo, Philippe, M. y otros, The effects of different cations on the physicochemical characteristics of casein micelles, Food Chemistry 90 (2005) 673-683).

En tales modalidades en las que la eliminación de calcio es por acidificación y posterior diálisis y/o ultrafiltración y/o diafiltración, el pH se ajusta para que esté en el intervalo de pH 4,6-6, o pH 4,8-5,5. La membrana elegida generalmente tiene un límite de peso molecular nominal de 10 000 Daltons o menos. Un ejemplo de una membrana de ultrafiltración útil es una membrana tipo Koch S4 HFK 131 con un peso molecular nominal cortado a 10 000 Daltons. El ajuste del pH se puede realizar con cualquier ácido adecuado para ajustar el pH de un alimento o bebida, por ejemplo, HCl diluido, H_2SO_4 diluido, ácido acético diluido, y ácido cítrico diluido.

Cuando la eliminación de calcio se realiza mediante la adición de un agente quelante, los agentes quelantes preferidos para su uso incluyen ácido cítrico, EDTA, fosfatos/polifosfatos alimentarios, acidulantes alimentarios, ácido tartárico, citratos y tartratos. En una modalidad, los agentes quelantes son agentes acidulantes de alimentos. En una modalidad, los agentes quelantes se usan junto con diálisis y/o ultrafiltración y diafiltración.

En una modalidad, los intercambiadores de cationes se basan en resinas que tienen grupos fuertemente ácidos, tales como grupos sulfonato. En una modalidad, la resina de intercambio catiónico ácido fuerte es IMAC HP 111 E fabricada por Rohm & Haas. Esta resina tiene una matriz de copolímero de estireno divinilbenceno. Los grupos funcionales son grupos de ácido sulfónico que pueden obtenerse en la forma Na^+ o alternativamente convertirse en la forma K^+.

En una modalidad, la composición de caseína disminuida en calcio es soluble en frío. El término "solubilidad en frío" o "soluble en frío" se refiere a la propiedad de un producto que al reconstituirse en una solución al 5 % p/v a 20 °C proporciona menos del 5 % de sedimento en la centrifugación durante 10 minutos a 700 g.

La caseína ácida se forma acidificando la leche desnatada hasta el punto isoeléctrico de la caseína - pH 4,6, lo que resulta en la precipitación de la caseína de la leche. La caseína ácida mineral se forma por acidificación de la leche desnatada por ácido mineral a un pH de entre 4,3 y 4,6. La caseína del ácido láctico se produce por acidificación de la leche usando bacterias de ácido láctico. La leche se enfría a una temperatura de aproximadamente 23-27 °C y se disminuye gradualmente el pH de la leche. Al pH deseado, la leche se calienta a 50-55 °C y se obtiene la caseína. Véase Fox & McSweeney, 2003 y el Dairy Processing Handbook, 2003.

El caseinato es una composición que comprende tanto caseína como un ion metálico monovalente o divalente. Las soluciones de hidróxido que comprenden iones de sodio, potasio y magnesio se usan para producir caseinato de sodio, caseinato de potasio o magnesio. Véase Fox & McSweeney, 2003 y el Dairy Processing Handbook, 2003.

La caseína translúcida procesada en UHP se produce sometiendo una composición que contiene caseína a un tratamiento a alta presión, como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2004/091309, incorporada en la presente descripción como referencia en su totalidad. En una modalidad, la composición de caseína se somete a un método para mejorar su claridad y/o propiedades de estabilidad sometiendo la composición a un tratamiento a presión de al menos aproximadamente 100 MPa para obtener una composición que tenga la claridad deseada, según se determina midiendo su densidad óptica (OD) a 610 nm. Una solución que tiene una lectura de cero OD es atravesada por el 100 % de la luz incidente, mientras que una muestra que tiene un OD de 1,0 es atravesada por el 10 % de la luz incidente, y así sucesivamente. Una solución con un OD de 1,0 generalmente se considera "opaca".

La caseína translúcida también puede producirse mediante intercambio catiónico de leche desnatada, concentrado de proteína de leche o aislado de proteína de leche usando los métodos descritos y ejemplificados en la solicitud de patente internacional WO2001/041579. Por ejemplo, un método adecuado comprende un método de preparación de una bebida láctea translúcida que tiene un pH en el rango 5,6-7,0, comprendiendo el método (a) proporcionar un material de partida de leche opaca que tiene un pH en el rango 5,7-6,5; (b) poner en contacto al menos una parte del material de partida con un intercambiador catiónico hasta que el porcentaje de transmisión del material (cuando se separa del intercambiador) se eleva al menos al 5 %, preferentemente al menos al 25 %, más preferentemente al menos al 40 %; (c) opcionalmente mezclar la muestra de leche translúcida con otra muestra de leche mientras se conserva el porcentaje de transmisión al menos 5 %, preferentemente al menos 25 %, con mayor preferencia al menos 40 %. La translucidez de la leche se puede medir con un analizador macroscópico Turbiscan MA 2000 (Formulaction, Toulouse, Francia) utilizando la transmisión de una fuente de luz pulsada de infrarrojo cercano (NIR) (λ = 850 nm). La muestra está contenida en una celda para la muestra especial y se pasa NIR a través de la muestra y un detector de transmisión recibe la luz que pasa a través de la muestra. El detector de transmisión adquiere el flujo de luz transmitido (en %) en función de la altura de la muestra (65 mm). Para la definición de translucidez, se toma un valor promedio de transmisión de 20 mm a 50 mm de altura de la celda para la muestra. La longitud de la trayectoria es de 1 cm.

3. Composiciones

Una composición útil en la presente descripción puede formularse como alimento, bebida, aditivo alimentario, aditivo para bebidas, suplemento dietético, producto nutricional, producto dietético, alimento médico, producto de alimentación enteral, producto de alimentación parenteral, sustitutivo de comidas, nutracéutico, medicamento o farmacéutico. Las formulaciones apropiadas pueden ser preparadas por un experto en la técnica con respecto a esa habilidad y la enseñanza de esta especificación.

En una modalidad, la composición es ácida. En otra modalidad, la composición es neutra. En diversas modalidades, la composición se formula para administración oral.

En diversas modalidades, la composición es cualquier producto de consumo comestible que pueda transportar proteínas. Los ejemplos de productos de consumo comestibles adecuados incluyen líquidos, productos de confitería que incluyen geles, helados, productos de frutas reconstituidas, barras de bocadillos, barras de alimentos, barras de granola, productos para untar, salsas, aderezos, productos lácteos que incluyen yogures y quesos, aderezos para mayonesa/ensaladas, bebidas incluyendo las bebidas lácteas y no lácteas (como las bebidas lácteas y las bebidas de yogur), suplementos deportivos que incluyen suplementos deportivos lácteos y no lácteos, aditivos alimentarios y productos de suplementos dietéticos.

En una modalidad, el alimento se selecciona de productos de confitería, una barra, un producto lácteo, leche, un producto de leche, una leche en polvo, leche reconstituida, leche cultivada, yogur, yogur para beber, yogur firme, una bebida, un aditivo alimentario, un aditivo de bebida, un suplemento dietético, un producto nutricional, un producto dietético o un alimento médico.

En una modalidad, la composición está en forma de *cachet*, un polvo, un polvo dispensable, gránulos, una suspensión, un elixir, un líquido o cualquier otra forma que se pueda añadir a alimentos o bebidas, incluyendo por ejemplo agua, leche o jugo de fruta.

En una modalidad, la composición se formula como una bebida. En una modalidad, la bebida es ácida. En otra modalidad, la bebida es neutra. En una modalidad, el pH de la composición es de aproximadamente 1 a aproximadamente 4,6. Preferentemente, el pH de la composición es de aproximadamente 2 a aproximadamente 3,7. En otra modalidad, el pH de la composición es de aproximadamente 1 a aproximadamente 14, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, de aproximadamente 9 a 14, de aproximadamente 1 a aproximadamente 9 o de aproximadamente 5 a aproximadamente 9.

En modalidades donde la composición es un líquido a pH ácido, la caseína se puede disolver e hidratar en agua y

añadir rápidamente ácido para disminuir el pH a 3,0 con agitación vigorosa. El pH pasará por el punto isoeléctrico de la caseína y la caseína se volverá a solubilizar.

En una modalidad, la composición está en forma de un alimento médico, que comprende además una fuente de lípidos, una fuente de carbohidratos, opcionalmente una fuente adicional de proteínas, y opcionalmente una fuente de vitaminas y minerales.

El lípido utilizado puede ser lípido vegetal o lípido animal, incluyendo lípidos lácteos y aceites de pescado. Los aceites vegetales a menudo son ilustrativos debido a su facilidad de formulación y menor contenido de ácidos grasos saturados. Los aceites vegetales ilustrativos incluyen aceite de canola (colza), aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de oliva o de soja.

El carbohidrato usado típicamente comprende carbohidratos digeribles como el 75-100 % del carbohidrato. El carbohidrato puede comprender monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos y mezclas de los mismos. Se usan típicamente oligosacáridos de glucosa. Varios de estos están disponibles comercialmente como maltodextrina (3-20 DE) o jarabe de maíz para los carbohidratos de cadena más larga (>20 DE). También se pueden incluir carbohidratos no digeribles, por ejemplo, fructooligosacáridos, inulina y galactooligosacáridos. Estos están típicamente presentes en cantidades de 0,2-5 % de la composición.

En modalidades ilustrativas, la composición nutricional líquida es una composición nutricionalmente completa o un líquido o polvo de alta energía para el desayuno u otros momentos del día.

En modalidades ilustrativas, la composición nutricional líquida contiene nutrientes que incluyen vitaminas y minerales. Los requerimientos diarios recomendados de vitaminas y minerales pueden especificarse para varios subgrupos de la población. Véanse, por ejemplo, las Referencias de Ingestión Dietética: RDA e IA para vitaminas y elementos, Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, Instituto de Medicina, Junta de Alimentos y Nutrición (2010): tablas de ingestión recomendada para bebés de 0-6, 6-12 meses, niños 1-3 y 4-8 años, adultos varones (6 clases de edad), mujeres (6 clases de edad), embarazadas (3 clases de edad) y lactantes (3 clases de edad). Las concentraciones de nutrientes esenciales en la composición nutricional líquida pueden adaptarse en el tamaño de porción ilustrativa para un subgrupo particular o condición médica o aplicación, para que los requisitos de nutrición y facilidad de suministro puedan cumplirse simultáneamente.

En una modalidad, la composición está en forma de una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable apropiado (que incluye excipientes, diluyentes, auxiliares y combinaciones de los mismos) seleccionado con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Edición Osol, A. Ed., Mack Publishing Co., 1980.

En consecuencia, la invención también se dirige a dosis, formas de dosificación, formulaciones, composiciones que comprenden caseína, incluyendo las descritas en la presente descripción, útiles para la terapia de enfermedades, trastornos y/o afecciones en humanos y otros mamíferos y otros trastornos como se describe en la presente descripción. El uso de estas formas de dosificación o formulaciones que comprenden una o más composiciones de la invención permite el tratamiento efectivo de estas afecciones. Las formas de dosificación, formulaciones o composiciones de la invención pueden formularse para optimizar la biodisponibilidad, o para devolver o mantener las concentraciones plasmáticas, sanguíneas o tisulares dentro del intervalo terapéutico normal, incluso durante períodos prolongados.

Las formas de dosificación, formulaciones o composiciones de la invención pueden formularse para administración periódica, por ejemplo, para proporcionar una exposición continua a una o más composiciones de la invención.

Los ejemplos de formas de dosificación adecuadas para administración oral incluyen, entre otros, tabletas, cápsulas, pastillas o formas similares, o cualquier forma líquida como jarabes, soluciones acuosas, emulsiones y similares, capaces de proporcionar una cantidad de caseína terapéuticamente efectiva de la caseína.

Otros ejemplos de formas de dosificación de la invención incluyen, pero no se limitan a formas de dosificación de liberación modificada (MR) que incluyen formas de liberación retardada (DR); formas de acción prolongada (PA); formas de liberación controlada (CR); formas de liberación extendida (ER); formas de liberación programada (TR); y formas de acción prolongada (LA). En su mayor parte, estos términos se usan para describir formas de dosificación administradas por vía oral, sin embargo, estos términos pueden ser aplicables a cualquiera de las formas de dosificación, formulaciones o composiciones descritas en la presente descripción. Estas formulaciones efectúan la liberación retardada total del fármaco durante algún tiempo después de la administración del fármaco, y/o la liberación del fármaco en pequeñas partes alícuotas intermitentemente después de la administración, y/o la liberación del fármaco lentamente a una velocidad controlada dirigida por el sistema de administración, y/o la liberación del fármaco a una velocidad constante que no varía y/o la liberación del fármaco durante un período significativamente más largo que las formulaciones habituales.

Las composiciones útiles en la presente descripción pueden usarse solas o en combinación con uno o más agentes

adicionales. El agente adicional puede ser un alimento, bebida, aditivo alimentario, aditivo para bebidas, suplemento dietético, producto nutricional, producto dietético, alimento médico, producto de alimentación enteral, producto de alimentación parenteral, sustitutivo de comidas, nutracéutico, medicamento o farmacéutico. El agente adicional puede aumentar la eficacia con la cual la caseína se descompone o la leucina se administra al torrente sanguíneo.

Cuando se usa en combinación con un agente adicional, la administración de una composición útil en la presente descripción y el otro agente, puede ser simultánea o secuencial. La administración simultánea incluye la administración de una forma de dosificación única que comprende todos los componentes o la administración de formas de dosificación separadas, sustancialmente al mismo tiempo. La administración secuencial incluye la administración de acuerdo con diferentes esquemas, preferentemente de manera que haya una superposición en los períodos durante los cuales se proporciona la composición útil en esta descripción y otro agente terapéutico.

Además, se contempla que una composición de acuerdo con la invención puede formularse con ingredientes activos adicionales que pueden ser beneficiosos para un sujeto en casos particulares. Por ejemplo, pueden usarse agentes, tales como agentes terapéuticos que se dirigen a las mismas o diferentes facetas de la afección, proceso o interés de la enfermedad. Los agentes adecuados se describieron anteriormente.

En una modalidad, los ingredientes activos adicionales pueden incluir lípidos, carbohidratos, otras proteínas, minerales o vitaminas, o agentes saborizantes.

En una modalidad, la composición puede comprender adicionalmente una fuente de aminoácidos, tal como aminoácidos libres, como se describe anteriormente.

En una modalidad, la composición puede complementarse con minerales, que incluyen, pero no se limitan a cloruro, sodio, calcio, hierro, cromo, cobre, yodo, zinc, magnesio, manganeso, molibdeno, fósforo, potasio y selenio. Las formas adecuadas de cualquiera de los minerales anteriores incluyen sales minerales solubles, sales minerales ligeramente solubles, sales minerales insolubles, minerales quelados, complejos minerales, minerales no reactivos tales como minerales de carbonilo y minerales reducidos, y combinaciones de los mismos.

Las composiciones también pueden comprender opcionalmente vitaminas. Las vitaminas pueden ser vitaminas liposolubles o solubles en agua. Las vitaminas adecuadas incluyen, pero sin limitación, vitamina C, vitamina A, vitamina E, vitamina B12, vitamina K, riboflavina, niacina, vitamina D, vitamina B6, ácido fólico, piridoxina, tiamina, ácido pantoténico y biotina. La forma de la vitamina puede incluir sales de la vitamina, derivados de la vitamina, compuestos que tienen la misma o similar actividad de una vitamina y metabolitos de una vitamina.

Debe entenderse que los agentes adicionales también pueden emplearse en un método de acuerdo con la invención en donde se administran por separado, simultánea o secuencialmente con una composición útil en la presente descripción. Las proporciones de cada componente en la composición se adaptan para optimizar la eficacia de la composición para suministrar leucina o aumentar la masa muscular en un sujeto que lo necesita.

Como se apreciará, la dosis administrada de la composición, el período de administración y el régimen de administración general pueden diferir entre sujetos en dependencia de variables tales como la gravedad de los síntomas de un sujeto, el tipo de trastorno a tratar, el modo de administración escogido, y la edad, sexo y/o salud general de un sujeto. Sin embargo, a manera de ejemplo general, los inventores contemplan la administración de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2500 mg por kg de peso corporal de una composición de caseína descrita en la presente descripción.

Debe apreciarse que la administración puede incluir una dosis diaria única o la administración de varias dosis discretas divididas, según sea apropiado. Debe entenderse que una persona de habilidad ordinaria en la técnica podrá, sin una experiencia indebida, teniendo en cuenta esa habilidad y esta descripción, determinar un régimen de dosificación efectivo (que incluye la dosis diaria y el momento de la administración) para una afección dada.

Las composiciones útiles de acuerdo con la invención pueden prepararse usando métodos conocidos en la técnica.

Los métodos para preparar una bebida de caseína ácida incluyen disolver en agua el polvo que contiene caseína para producir una solución a la que se agrega azúcar, sabor y colorante. La mezcla se enfría a menos de 30 grados Celsius y el pH se ajusta a 4,1 usando una solución mezclada de ácido cítrico y ácido láctico. Se agrega agua hasta el volumen deseado y la composición se homogeneiza y se pasteuriza.

Las composiciones neutras se preparan disolviendo en agua el polvo que contiene caseína para producir una solución, a la que se añaden azúcar, sabor y colorante. La mezcla se enfría a menos de 30 grados Celsius y la solución se ajusta al pH deseado. La composición se homogeneiza y se trata con calor a 140 grados Celsius.

4. Resultados terapéuticos y métodos de evaluación de los resultados terapéuticos

El consumo de una composición de la invención por un sujeto puede dar como resultado uno cualquiera o más de los

siguientes, o cualquier combinación de dos o más de estos, preferentemente al mismo nivel sustancialmente que la proteína de suero:

a) mantenimiento o aumento de la síntesis de proteínas musculares,
b) mantenimiento o aumento de la masa muscular,
c) prevención o reducción de la pérdida de masa muscular,
d) crecimiento sostenido o aumentado,
e) prevención o disminución del catabolismo muscular,
f) prevención o tratamiento de la caquexia,
g) prevención o tratamiento de la sarcopenia,
h) aumento de la velocidad de resíntesis de glucógeno,
i) modulación de los niveles de azúcar en la sangre,
j) aumento de la respuesta de la insulina a la concentración elevada de glucosa en sangre,
k) aumento de la saciedad,
l) reducción de la llenura,
m) ingestión reducida de alimentos,
n) ingestión reducida de calorías,
o) metabolismo de glucosa mejorado,
p) aumento de la velocidad de recuperación después de la cirugía,
q) aumento de la velocidad de recuperación después de una lesión,
r) aumento de la velocidad de recuperación después del ejercicio, o
s) mayor desempeño deportivo.

El método para lograr los efectos anteriores comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de una composición de caseína, como se describe en la presente descripción, de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. Debe entenderse que en algunas modalidades el consumo de una composición de la invención por un sujeto puede dar como resultado al menos el mantenimiento de uno de los efectos anteriores. Por ejemplo, mantener la masa muscular o mantener la concentración de leucina en el suero sanguíneo.

La eficacia de una composición útil de acuerdo con la invención puede evaluarse tanto *in vitro* como *in vivo,* y los métodos para ello se conocen en la técnica. Brevemente, en una modalidad, se puede analizar una composición candidata para determinar su capacidad, por ejemplo, para normalizar o restaurar los niveles de leucina o la masa muscular. Para estudios *in vivo*, se puede alimentar o administrar a un animal (por ejemplo un ratón) con una composición y después evaluar sus efectos en la restauración del suministro de leucina. En base a los resultados, puede determinarse un intervalo de dosificación y una vía de administración apropiados.

Además, el consumo de una composición de la invención por un sujeto puede dar como resultado uno o más de: aumentar la velocidad de vaciado gástrico después de la ingestión de la composición, aumentar la digestibilidad de una composición de proteína o aumentar la velocidad de suministro de aminoácidos a la sangre. Los métodos para evaluar el vaciado gástrico, la digestibilidad y el suministro de aminoácidos se conocen en la técnica.

4.1 Mayor suministro de leucina

La evaluación de la concentración de leucina en suero sanguíneo después de una comida es un factor importante para evaluar la capacidad de una comida rica en proteínas para estimular el metabolismo de las proteínas musculares. La evaluación de la leucina en suero sanguíneo después de una comida se logra tomando y analizando muestras de sangre de referencia y colectando muestras en serie en el período postprandial (hasta 3 horas postprandial).

La concentración de leucina en suero sanguíneo se puede evaluar de acuerdo con los métodos de los ejemplos a continuación, o de la siguiente manera. Las muestras de sangre se colectan tubos de ensayo vacutainer heparinizados. Se añaden 100 µl de sangre completa al ácido perclórico frío y se enfrían durante 10 minutos para permitir que precipiten las proteínas. Después de la centrifugación a 4000 g durante 2 minutos, se añaden 250 µl de $KHCO_3$ para neutralizar la solución. El sobrenadante se almacena a -80 °C hasta su posterior análisis. El análisis de aminoácidos se logra mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) completa con estándares adecuados.

4.2 Aumento y disminución de la síntesis de proteínas musculares

La síntesis de proteínas musculares se evalúa por los cambios en el balance de proteínas dentro de un músculo. Hay varios métodos disponibles para evaluar los cambios en el balance de proteínas. Por lo general, los métodos implican medir la velocidad fraccional de síntesis de proteínas musculares dentro de un período de tiempo establecido (es decir, 2-3 horas postprandial). Brevemente, los participantes tienen una biopsia muscular basal tomada del vasto lateral utilizando protocolos estándares, y la muestra muscular se seca, se extrae grasa y tejido conectivo visibles y la muestra se congela en nitrógeno líquido y se almacena a -80 °C hasta un análisis posterior.

Después de abstenerse de cualquier actividad física extenuante durante tres días, los sujetos tienen un catéter insertado en su vena antecubital para la toma de muestras de sangre. Después de la toma de muestras de sangre de

referencia, se inserta un segundo catéter en su brazo colateral para la administración de una infusión preparada y constante de L-[anillo-$^{13}C_6$]fenilalanina. Tres horas después del inicio de la infusión, el sujeto se somete a una biopsia muscular de la extremidad colateral (de la medida inicial) para medir las velocidades de síntesis de proteínas en ayuno. Se extraen muestras de sangre y los sujetos consumen una bebida de proteína (enriquecida con 6 % de L-[anillo-$^{13}C_6$]fenilalanina, para minimizar las alteraciones en el equilibrio isotópico) para estimular la síntesis de proteína muscular en el período postprandial. Tres horas después de la administración del producto proteico, se toma una biopsia muscular final para evaluar la respuesta de síntesis de proteínas que se produjo en el período postprandial.

El análisis de las muestras se realiza mediante el aislamiento de proteínas intracelulares de un pedazo de músculo fresco. La muestra se centrifuga durante 10 minutos para separar las proteínas miofibrilares y de colágeno. La eliminación de las proteínas sarcoplasmáticas se logra mediante precipitación con ácido perclórico. Las proteínas miofibrilares se solubilizan agregando NaOH y mezclando cada 10 minutos. La centrifugación a 4000 g crea un sobrenadante que contiene las proteínas miofibrilares, que se precipita con ácido perclórico, se lava y se liofiliza. Los aminoácidos se liberan usando HCl y la muestra se calienta a 110 °C durante 24 horas. Los aminoácidos libres se purifican usando cromatografía de intercambio catiónico, y se convierten en sus derivados de éster de N-acetil-n-propilo para su análisis por espectrometría de masas de relación combustión-aislado de cromatografía de gases.

La velocidad sintética fraccional se calcula usando las fórmulas:

FSR (% h-1) = Ep/Em X 1/t X 100

Donde 'Ep' es el cambio entre las dos muestras de biopsia en el enriquecimiento de proteínas unidas, 'Em' es el enriquecimiento promedio de la fenilalanina intracelular entre las dos muestras y 't' es el tiempo entre las biopsias.

4.3 Reducción de la pérdida de masa muscular

Los cambios en la masa muscular se evalúan utilizando medidas repetidas de la composición corporal con una técnica adecuada de análisis de la composición corporal multicompartimental, como la absorpitrometría de rayos X de energía dual, o un modelo multicompartimental derivado de la hidrodensitometría o la densidad corporal total.

Los métodos para evaluar la saciedad y la llenura son conocidos en la técnica. Los métodos adecuados se informan, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional publicada WO2010/107325 (PCT/NZ2010/000042) titulada "Satiety Product".

4.5 Vaciado gástrico y digestibilidad

Los métodos para evaluar la velocidad de vaciado gástrico y digestibilidad se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, LA Szarka y M. Camilleri, "Methods for measurement of gastric motility", Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 296: G461-G475, 2009, y A. J. Darragh and S. M. Hodgkinson, "Quantifying die Digestibility of Dietary Protein", J Nutr. Julio de 2000; 130(7):1850S-6S,

Varios aspectos de la invención se ilustrarán ahora de manera no limitativa haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

A continuación se proporciona una descripción de cada uno de los ingredientes utilizados en los ejemplos.

Concentrado de proteína de leche estándar (aproximadamente 85 % de proteína en peso seco, aproximadamente 3,279 g de calcio/100 g de proteína caseína; Fonterra Co-operative Group Limited, Nueva Zelanda). Este se produce por ultrafiltración y diafiltración, a partir de leche desnatada (Fox PF, editores McSweeney PLH, Advanced Dairy Chemistry, Volumen 1 - Proteins, 3ra edición, editorial Kluwer Academic/Plenum, NY, 2003).

El concentrado de proteína de leche disminuido en calcio (aproximadamente 85 % de proteína en peso seco, aproximadamente 80 % disminuido en calcio - aproximadamente 0,411 g de calcio/100 g de proteína caseína; Fonterra Co-operative Group Limited, Nueva Zelanda) se produjo mediante los métodos descritos en solicitud PCT internacional publicada WO 2001 041578.

Concentrado de proteína de suero (aproximadamente 80 % de proteína en peso seco, aproximadamente 0,5 g de calcio/100 g de proteína de suero; Fonterra Co-operative Group Limited, Nueva Zelanda). Este se produce por ultrafiltración y diafiltración de suero de queso (Fox PF, editores McSweeney PLH, Advanced Dairy Chemistry, Volumen 1 - Proteins, 3ra edición, editorial Kluwer Academic/Plenum, NY, 2003).

El caseinato de calcio (CaCas, aproximadamente 90 % de proteína en peso seco, aproximadamente 1,5 g de calcio/100 g de proteína de caseína; Fonterra Co-operative Group Limited, Nueva Zelanda) se produjo solubilizando caseína en agua y ajustando el pH a 6,7 usando hidróxido de calcio (Fox PF, editores McSweeney PLH, Advanced

Dairy Chemistry, Volumen 1 - Proteins, 3ra edición, editorial Kluwer Academic/Plenum, NY, 2003).

El caseinato de sodio (NaCas, aproximadamente 90 % de proteína en peso seco, aproximadamente 0,033 g de calcio/100 g de proteína de caseína; Fonterra Co-operative Group Limited, Nueva Zelanda) se produjo solubilizando caseína en agua y ajustando el pH a 6,7 usando hidróxido de sodio (Fox and McSweeney, 2003).

Ejemplo 1: Comparación de varios ingredientes proteicos para suministrar leucina al torrente sanguíneo.

Cada uno de los ingredientes proteicos se preparó como se describe anteriormente.

Quince sujetos de entre 18 y 49 años se seleccionaron para participar en el ensayo. Los criterios de exclusión para el ensayo incluyeron el uso regular de suplementos de proteínas, un BMI mayor de 30 kg/m^2, antecedentes de diabetes mellitus - Tipo I o II, o enfermedad cardíaca, enfermedad crónica del tracto gastrointestinal (por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal), cirugía gastrointestinal previa, embarazo, alergias a cualquier proteína de la dieta (como lácteos o soja), comorbilidad grave que, en opinión del investigador, podría evitar que el sujeto complete con éxito el ensayo y haber participado en cualquier ensayo clínico dentro de los últimos tres meses.

Se introdujo una vía intravenosa a cada sujeto y se obtuvo una muestra de sangre de referencia. Los sujetos ayunaron durante 10 horas antes de consumir una solución de 250 ml que comprende uno de los cuatro ingredientes proteicos, equilibrado para el contenido de leucina a 2,5 g de leucina por 250 ml de solución ajustando la cantidad de ingredientes proteicos añadidos. El consumo del ingrediente se restringió a un período de 5 minutos.

Después del consumo, se obtuvieron muestras de sangre adicionales a los 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos.

El plasma se separó y se almacenó a -80 °C hasta el análisis. Las muestras de plasma se desproteinizaron a través de filtros de 100 kD, y una parte alícuota de la muestra desproteinizada se transfirió a un tubo pequeño y se secó al vacío. La muestra seca se derivatizó con fenilisotiocianato (PITC), se secó al vacío y se reconstituyó en un tampón de disolución.

La concentración de leucina se midió usando cromatografía líquida de fase inversa con detección a 254 nm.

Los resultados se muestran en las Figuras 1 a 4 y muestran que la mayor concentración plasmática de leucina se logró después del consumo del concentrado de proteína de leche disminuido en calcio (A). Los niveles de leucina fueron comparables a los alcanzados después del consumo del concentrado de proteína de suero estándar (B). A los 30 minutos después del consumo, la concentración plasmática del concentrado de proteína de leche estándar (C) y CaCas (D) había alcanzado un pico, mientras que las concentraciones de leucina en plasma todavía aumentaron para el concentrado de proteína de leche disminuido en calcio y el concentrado de proteína de suero. La concentración máxima de leucina en plasma se alcanzó 45 minutos después del consumo del concentrado de proteína de leche disminuido en calcio y el concentrado de proteína de suero. Esta concentración fue significativamente diferente a la concentración de leucina plasmática lograda después del consumo de CaCas ($p < 0,001$). Además, la concentración de leucina en plasma se mantuvo en un nivel mayor durante un período más largo después del consumo, en comparación con los otros ingredientes proteicos. Una vez más, la concentración de leucina en plasma fue significativamente mayor para el concentrado de proteína de leche disminuido en calcio y el concentrado de proteína de suero en comparación con CaCas.

La concentración máxima de leucina después del consumo de MPC disminuido en calcio (A) y WPC (B) fue significativamente diferente a la concentración de leucina plasmática lograda después del consumo de MPC estándar (C) ($p < 0,012$) o caseinato de calcio (D) ($p < 0,0001$). La disponibilidad de aminoácidos en los primeros 180 minutos, según lo evaluado por el cálculo del el área bajo la curva, fue significativamente mayor después del consumo de MPC disminuido en calcio y el WPC que el caseinato de calcio ($p < 0,0051$). La disponibilidad de aminoácidos en los primeros 60 minutos, según lo evaluado por el cálculo del área bajo la curva, fue significativamente mayor después del consumo de MPC disminuido en calcio que el MPC estándar ($p = 0,0123$) o el caseinato de calcio ($p < 0,0001$) y significativamente diferente entre el WPC y el caseinato de calcio ($p < 0,0001$).

Ejemplo 2: La eficacia de las composiciones de caseína para suministrar leucina al torrente sanguíneo y para aumentar la masa muscular

Este ejemplo describe un ensayo clínico aleatorizado para evaluar la eficacia de las composiciones de caseína para suministrar leucina a un sujeto. También se describirá la eficacia de la composición para aumentar la masa muscular en un sujeto.

Los participantes del ensayo se seleccionarán de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión detallados en el Ejemplo 1. Todos los participantes se colocarán aleatoriamente en grupos y se alimentarán con una dosis única de una composición de tratamiento.

Las composiciones de tratamiento pueden incluir una fracción de α-caseína, β-caseína o kappa-caseína,

composiciones de caseína reducida en calcio, caseinato de sodio, caseína en una bebida ácida, o como controles positivos caseína a pH neutro con la concentración en el suero o en la proteína de leche con niveles normales de calcio.

El resultado primario del ensayo será evaluar la concentración de leucina en plasma después del consumo de las diversas composiciones de proteínas. Los resultados secundarios incluyen la evaluación de las concentraciones plasmáticas de isoleucina y valina, la velocidad de vaciado gástrico (medido con ultrasonografía) y los efectos gastrointestinales agudos después del consumo de las composiciones de proteínas. Las concentraciones séricas de aminoácidos se determinarán mediante el método de Bloomfield, FH y otros, (Effects of Intrauterine Growth Restriction and Intraamniotic Insulin-like Growth Factor-I Treatment on Blood and Amniotic Fluid Concentrations and on Fetal Gut Uptake of Amino Acids in Late-Gestation Ovine Fetuses, J. Ped. Gast. Nutr. (2002) 35:287-297), incorporado en la presente como referencia.

Los datos mostrarán una mayor concentración de leucina en plasma y un vaciado gástrico mejorado en sujetos alimentados con las composiciones de prueba. Las concentraciones de leucina en plasma alcanzadas son comparables al control positivo y mejores que las composiciones de control negativo.

Ejemplo 3: La eficacia de las composiciones de caseína para suministrar leucina al torrente sanguíneo

Cada uno de los ingredientes proteicos se preparó como se describió anteriormente, excepto que se usó caseinato de sodio en lugar de caseinato de calcio.

Veinte sujetos de entre 18 y 49 años se seleccionaron para participar en el ensayo. Los criterios de exclusión para el ensayo incluyeron el uso regular de suplementos de proteínas, un BMI mayor de 30 kg/m^2, antecedentes de diabetes mellitus - Tipo I o II, o enfermedad cardíaca, enfermedad crónica del tracto gastrointestinal (por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal), cirugía gastrointestinal previa, embarazo, alergias a cualquier proteína de la dieta (como lácteos o soja), comorbilidad grave que, en opinión del investigador, podría evitar que el sujeto complete con éxito el ensayo y haber participado en cualquier ensayo clínico dentro de los últimos tres meses.

Se introdujo una vía intravenosa a cada sujeto y se obtuvo una muestra de sangre de referencia. Los sujetos ayunaron durante 10 horas antes de consumir una solución de 250 ml que comprende uno de los cuatro ingredientes proteicos, equilibrado para el contenido de leucina a 2,5 g de leucina por 250 ml de solución ajustando la cantidad de ingredientes proteicos añadidos. El consumo del ingrediente se restringió a un período de 5 minutos.

Después del consumo, se obtuvieron muestras de sangre adicionales a los 0, 45 y 90 minutos.

El plasma se separó y se almacenó a -80 °C hasta el análisis. Las muestras de plasma se desproteinizaron a través de filtros de 100 kD, y una parte alícuota de la muestra desproteinizada se transfirió a un tubo pequeño y se secó al vacío. La muestra seca se derivatizó con fenilotiocianato (PITC), se secó al vacío y se reconstituyó en un tampón de disolución.

Las concentraciones de aminoácidos se midieron usando cromatografía líquida de fase inversa con detección a 254 nm.

Los resultados se muestran en las Figuras 5 a 7 y muestran que la mayor concentración plasmática máxima de leucina se logró después del consumo del concentrado de proteína de leche disminuido en calcio (B) y caseinato de sodio (D). Los niveles de leucina fueron comparables a los alcanzados después del consumo del concentrado de proteína de suero estándar (A). La concentración máxima fue significativamente diferente a la concentración de leucina plasmática lograda después del consumo de MPC estándar (C) ($p < 0{,}001$) (Figura 7). La disponibilidad de aminoácidos en los primeros 90 minutos, según lo evaluado por el cálculo del área bajo la curva, fue significativamente mayor después del consumo de concentrado de proteína de leche disminuido en calcio, concentrado de proteína de suero y caseinato de sodio que el concentrado de proteína de leche estándar ($p < 0{,}05$) (Figura 6).

Ejemplo 4: Coagulación en un modelo gástrico simulado

Se preparó fluido gástrico simulado (SGF) (Convención de Farmacopea de Estados Unidos, 1995) y se calentó a 37 °C. La viscosidad se midió a 20 °C mediante el uso de un reómetro tal como un instrumento Anton Paar usando una paleta de acero inoxidable, Velocidad de corte = $75s^{-1}$. Las soluciones de proteínas se prepararon agitando el polvo a 50 °C durante una hora para dar una solución completamente hidratada. Se mezclaron volúmenes iguales de solución de proteína a 37 °C y SGF y el pH de la solución se redujo a 1,2 añadiendo HCl 6 M o HCl 1 M. Las mezclas se agitaron mientras se agregaba el ácido. La mezcla se añadió a la copa del reómetro y comenzó la agitación. La viscosidad se midió durante 5 minutos y luego se añadió pepsina (relación E:S de 1:40). La viscosidad se controló luego durante otros 50 minutos. Después de 50 minutos, se descartó el contenido de la copa de muestra. Como se muestra en la Figura 8, se observaron diferencias menores entre caseinato de sodio (A), MPC disminuido en calcio (B) o MPC estándar (C) para la viscosidad. Estas diferencias desaparecieron a los 30 minutos de la adición de pepsina.

Los expertos en la materia entenderán que la descripción anterior se proporciona solo a modo de ilustración y que la invención no se limita a la misma.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición de caseína para aumentar la concentración de leucina libre en suero sanguíneo en un sujeto, en donde la composición de caseína comprende o la caseína está en forma de un concentrado o aislado de proteína de leche disminuido en calcio (MPC o MPI), la caseína está de 10 a 100 % disminuida en calcio, tiene un grado de hidrólisis inferior al 1 % y tiene un patrón de fosforilación no modificado; y
en donde el uso no tiene el propósito de llevar a cabo una terapia en el cuerpo humano o animal.

2. El uso de una composición de caseína para aumentar la velocidad de vaciado gástrico después de la ingestión de la composición, para aumentar la digestibilidad de una composición de proteína o aumentar la velocidad de suministro de aminoácidos a la sangre, en donde la composición de caseína comprende o la caseína está en forma de un concentrado o aislado de proteína de leche disminuido en calcio (MPC o MPI), la caseína está de 10 a 100 % disminuida en calcio, tiene un grado de hidrólisis inferior al 1 % y tiene un patrón de fosforilación no modificado; y
en donde el uso no tiene el propósito de llevar a cabo una terapia en el cuerpo humano o animal.

3. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la caseína aumenta la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo en un sujeto dentro de los 15, 30, 45 o 60 minutos de administración.

4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la caseína puede aumentar la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo a al menos 205 a 400 µmol/L.

5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la caseína puede aumentar la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo a al menos 205 µmol/L durante al menos 5 a 50 minutos.

6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la caseína puede aumentar la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo a al menos 105 a 400 µmol/L.

7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la caseína puede aumentar la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo a al menos 105 µmol/L durante al menos 5 a 50 minutos.

8. Un uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la caseína permanece soluble a un pH de 1 a 5, permanece soluble en el tracto gastrointestinal, permanece soluble en el fluido gastrointestinal, no forma un coágulo a un pH de 1 a 5, o no forma un coágulo en el tracto gastrointestinal.

9. Un uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la caseína está sustancialmente libre de calcio unido.

10. Un uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición de caseína comprende una composición de caseína disminuida en calcio;
leche desnatada disminuida en calcio;
leche desnatada en polvo disminuida en calcio;
leche entera disminuida en calcio;
leche entera en polvo disminuida en calcio;
caseinato, caseinato de sodio, caseinato de potasio, caseinato de zinc, caseinato de magnesio;
un concentrado o aislado de proteína de leche modificado para disociar las micelas de caseína;
caseína no micelar;
un ingrediente de caseína, como un MPC o MPI, donde al menos una porción del calcio o fosfato o tanto el calcio como el fosfato se reemplazaron por sodio, potasio, zinc, magnesio y similares, o una combinación de cualquiera de dos o más de los mismos;
una caseína soluble en ácido;
un caseinato no micelar;
micelas de caseína quelada;
una caseína modificada con carga;
una caseína glicosilada;
una caseína modificada para disminuir su capacidad de formar un coágulo a pH ácido, preferentemente a un pH por debajo de pH 5, pH 4 o pH 3;
una caseína modificada para acelerar su capacidad de hidrolizarse en el tracto gastrointestinal;
un ingrediente de caseína con una relación alterada de caseína a suero;
una caseína de ácido láctico;
una caseína ácida mineral;
una o más fracciones de caseína;
una fracción de alfa-caseína;
una fracción de beta-caseína;
una fracción de kappa-caseína; o
cualquier combinación de cualquiera de dos o más de los mismos.

11. Un uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la caseína es estable a un pH de 1 a 5.

12. Un uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el aumento de la concentración de leucina en suero sanguíneo da como resultado cualquiera de uno o más de los siguientes:
    a) mantenimiento o aumento de la síntesis de proteínas musculares,
    b) mantenimiento o aumento de la masa muscular,
    c) prevención o reducción de la pérdida de masa muscular,
    d) crecimiento sostenido o aumentado,
    e) prevención o disminución del catabolismo muscular,
    f) aumento de la velocidad de resíntesis de glucógeno,
    g) modulación de los niveles de azúcar en la sangre,
    h) aumento de la respuesta de la insulina a la concentración elevada de glucosa en sangre,
    i) aumento de la saciedad,
    j) reducción de la llenura,
    k) ingestión reducida de alimentos,
    l) ingestión reducida de calorías,
    m) metabolismo de glucosa mejorado,
    n) aumento de la velocidad de recuperación después del ejercicio, o
    o) mayor desempeño deportivo.

13. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición comprende al menos 0,01 a 99 % en peso de caseína o la composición comprende 0,01 a 99 % en peso de proteína y la proteína comprende 0,01 a 99 % en peso de caseína.

14. Un uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la caseína contiene 0 a 3 g de calcio/100 g de caseína.

15. Una composición de caseína para el uso en a) prevenir o tratar la caquexia en un sujeto, b) prevenir o tratar la sarcopenia en un sujeto, c) aumentar la velocidad de recuperación después de la cirugía en un sujeto, o d) aumentar la velocidad de recuperación después de una lesión en un sujeto, aumentando la concentración de leucina libre en el suero sanguíneo en el sujeto;
    en donde la caseína es de 10 al 100 % disminuida en calcio, tiene un grado de hidrólisis inferior al 1 % y tiene un patrón de fosforilación no modificado; y
    en donde la composición de caseína comprende o la caseína está en forma de un concentrado o aislado de proteína de leche disminuido en calcio (MPC o MPI).

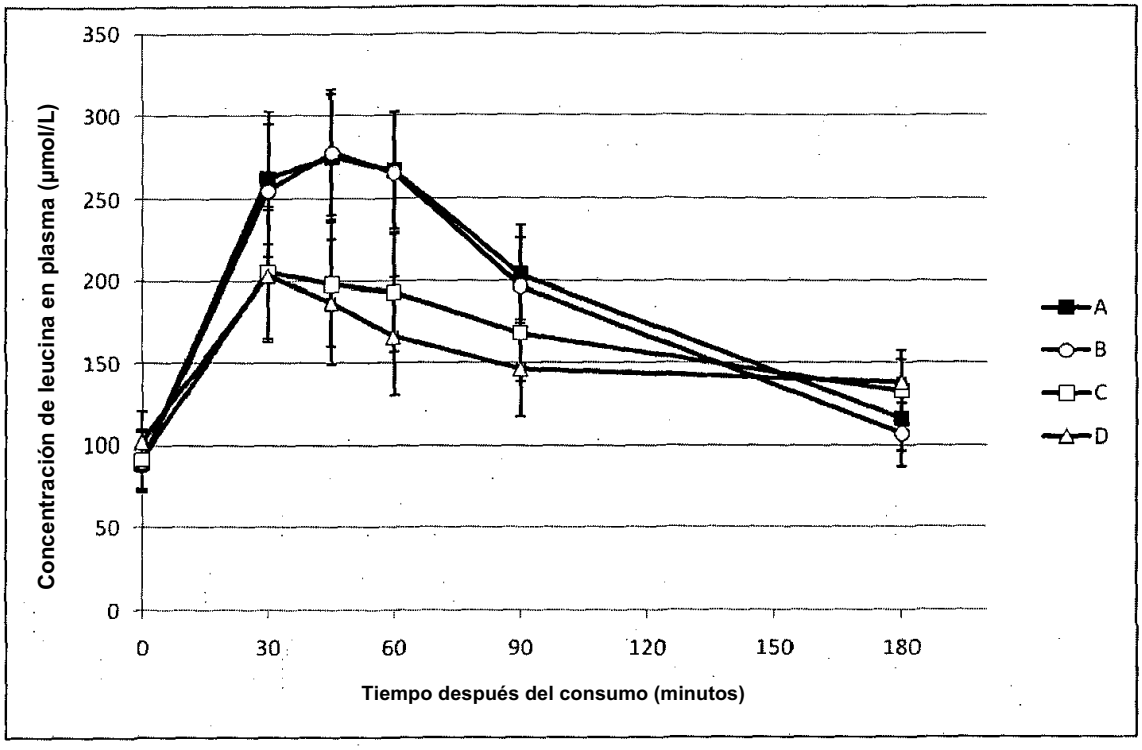

FIGURA 1

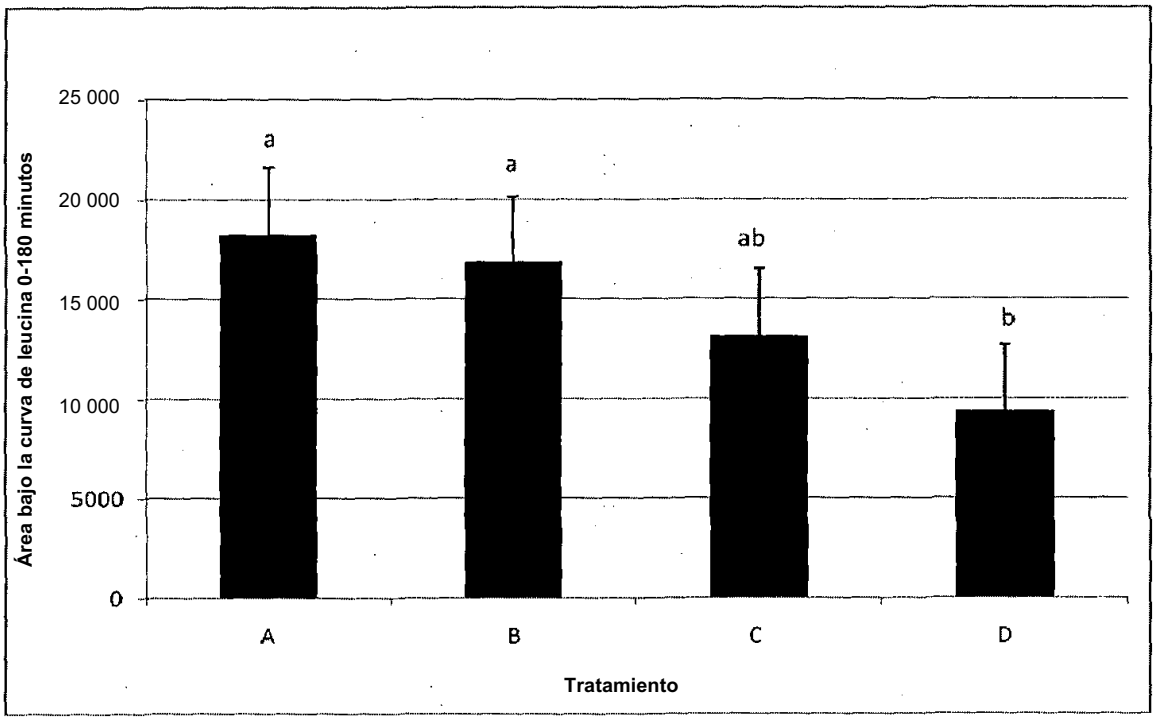

FIGURA 2

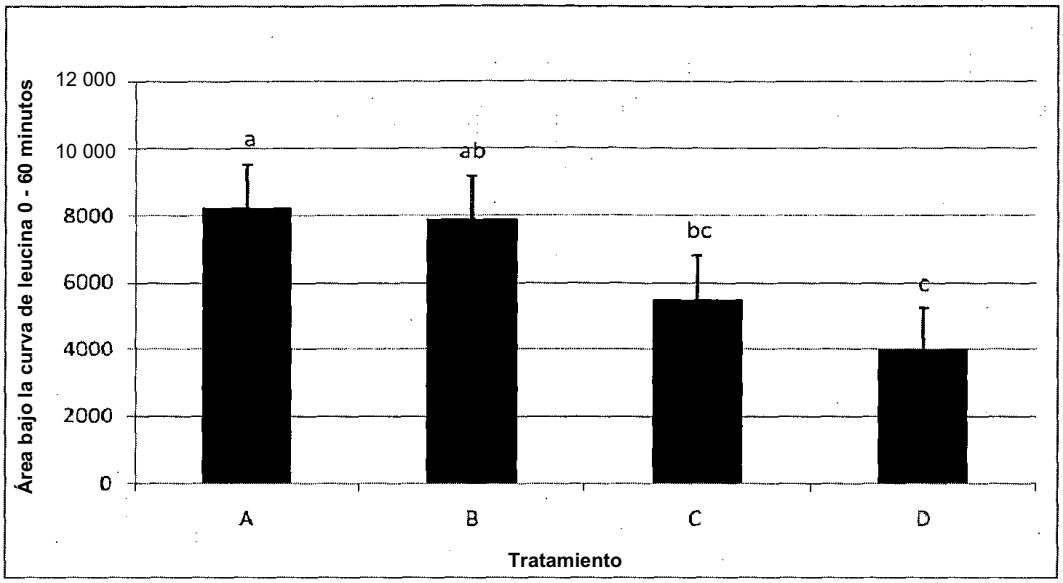

FIGURA 3

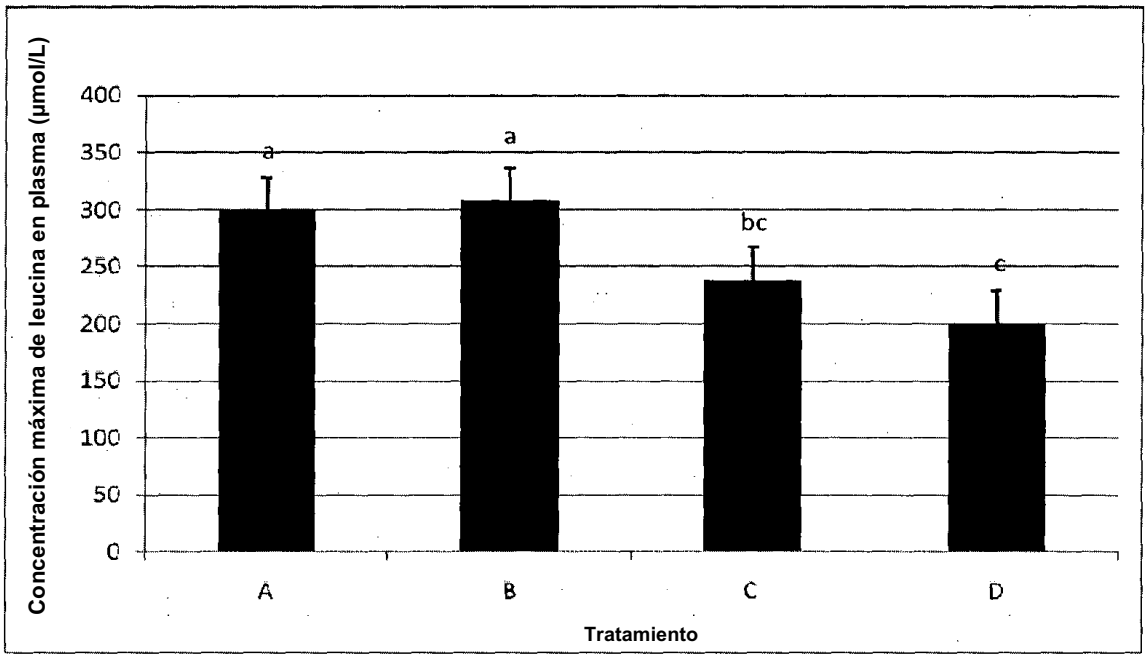

FIGURA 4

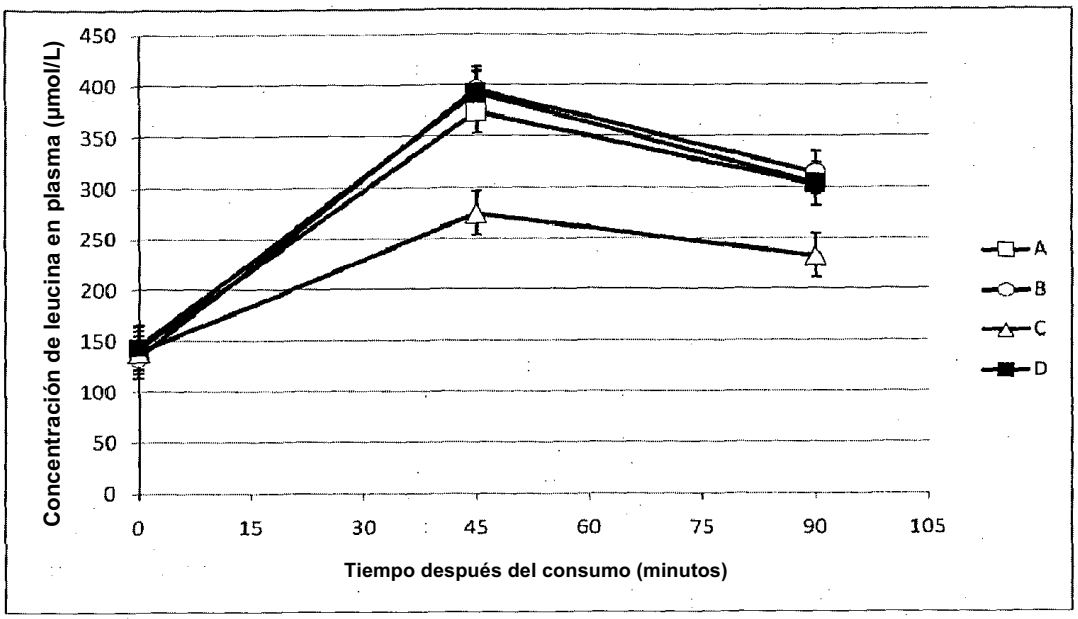

FIGURA 5

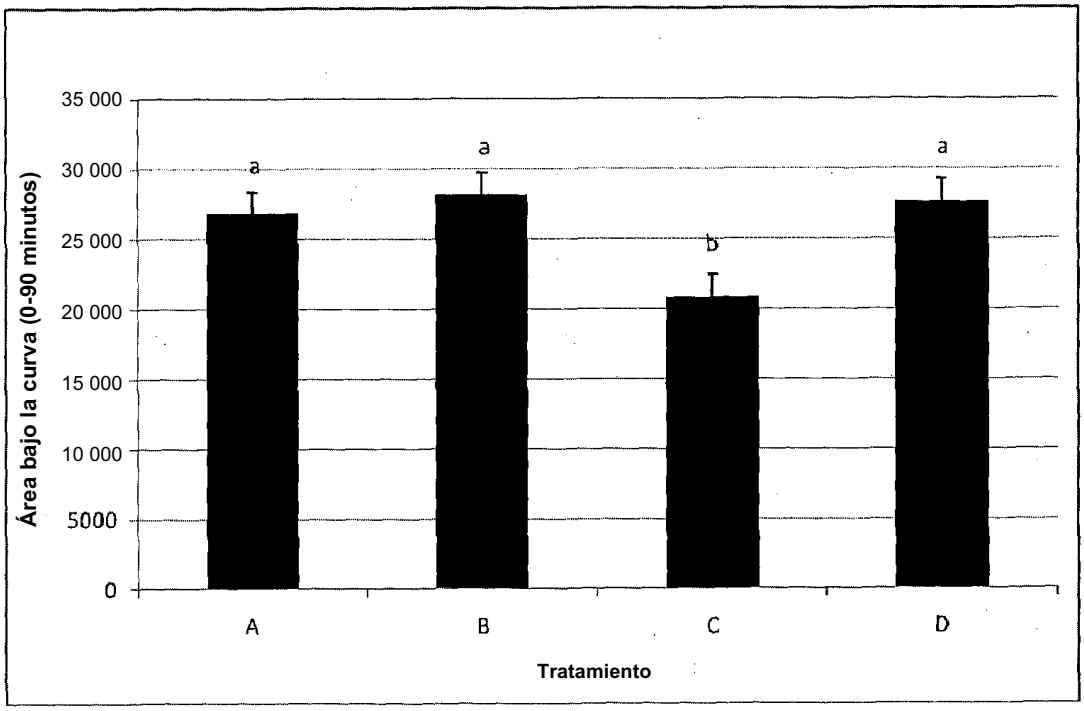

FIGURA 6

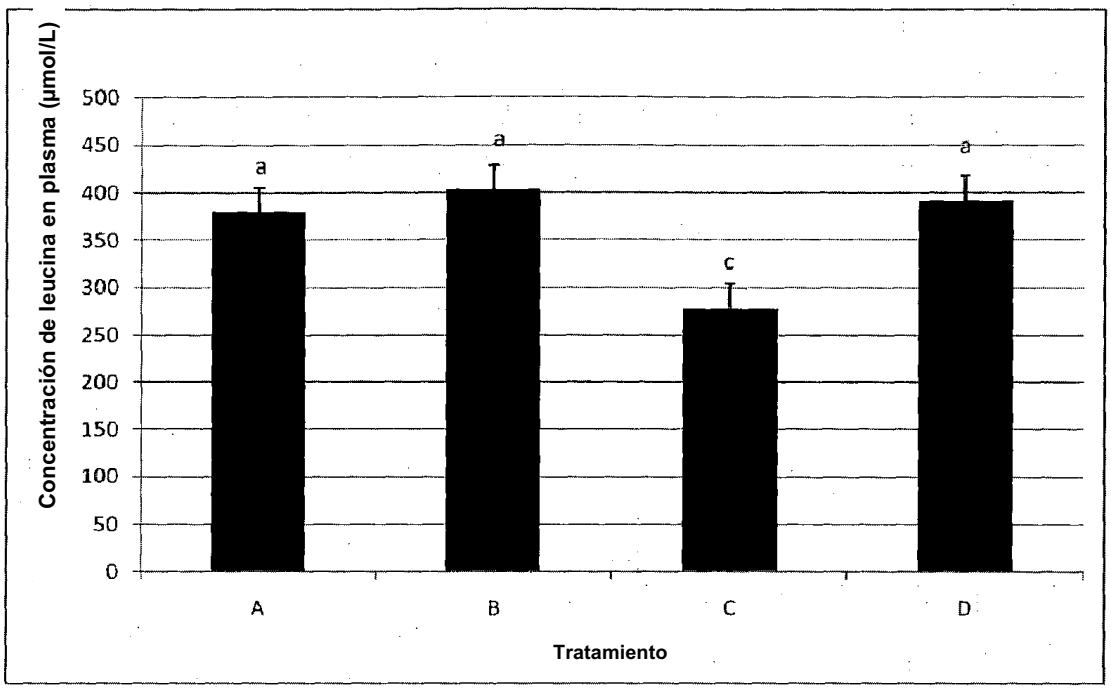

FIGURA 7

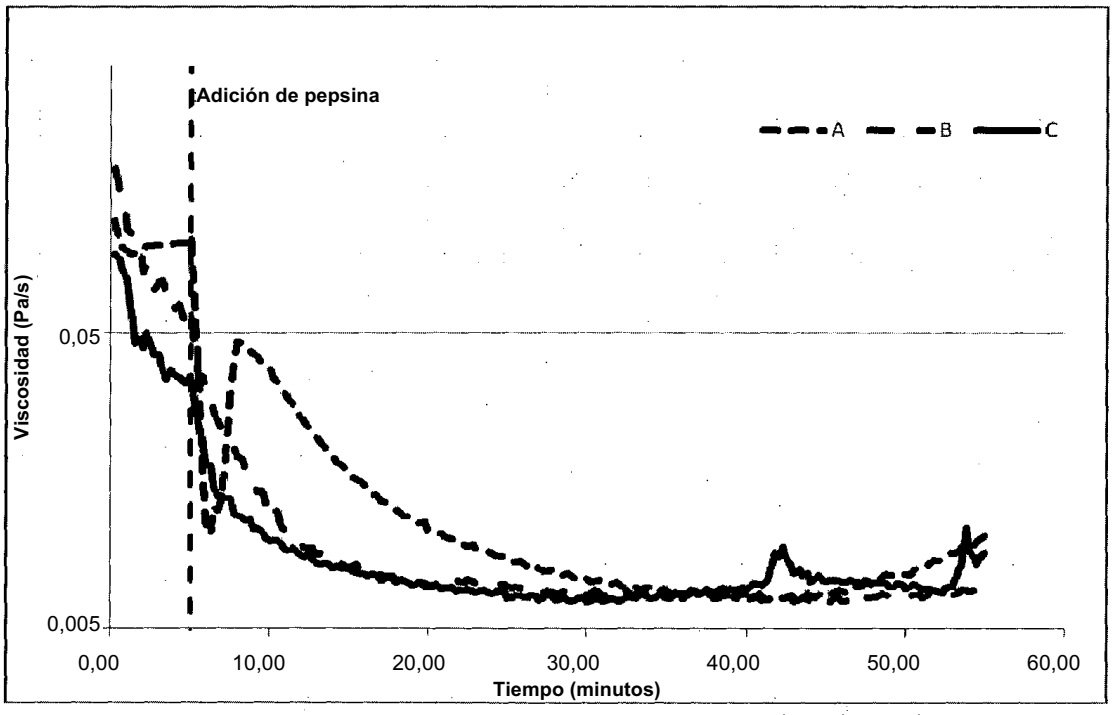

FIGURA 8