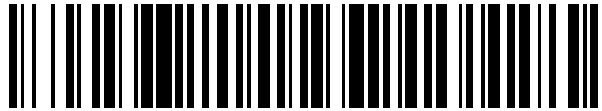


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 828 513**

51 Int. Cl.:

A61K 8/66 (2006.01)

A61K 38/01 (2006.01)

A61Q 3/00 (2006.01)

A61Q 5/00 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2014 PCT/EP2014/075934**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15090906**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2014 E 14805274 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2020 EP 3082837**

54 Título: **Composiciones que comprenden hidrolizado de lisozima para uso en tejido que contiene queratina**

30 Prioridad:
18.12.2013 US 201361917668 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.05.2021

73 Titular/es:
**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:
**GORALCZYK, REGINA;
MOHAJERI, HASAN y
WITTEWER SCHEGG, JONAS**

74 Agente/Representante:
GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 828 513 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden hidrolizado de lisozima para uso en tejido que contiene queratina

Esta invención se refiere al uso no terapéutico de una formulación oral de péptidos que contienen el aminoácido triptófano ("Trp") para beneficiar la producción y el mantenimiento de los tejidos de la piel, el cabello y las uñas. Los péptidos actúan aumentando la concentración de un aminoácido diferente, cisteína ("Cys"), así como cisteína y glutatión en la sangre. Cys es necesaria para la síntesis de queratina, un componente clave en la síntesis de piel, cabello y uñas. Esta invención también se refiere a suplementos nutricionales, alimentos y otras formulaciones que proporcionan una cantidad beneficiosa para la piel, el cabello y/o la piel, de péptidos que contienen TRP.

Antecedentes de la invención

La queratina es una familia de proteínas estructurales fibrosas, y es el material estructural clave que forma la capa externa de la piel y también el cabello y las uñas. Las proteínas de queratina contienen una gran cantidad de cisteína (Cys) (aproximadamente el 14%). Dado que las células queratinizadas mudan y se reemplazan constantemente, es importante que el cuerpo tenga un gran acumulado de Cys biodisponibles para la síntesis de proteínas.

Cys se considera un aminoácido no esencial, pero en algunos casos, como en bebés, ancianos e individuos con ciertas enfermedades metabólicas o síndrome de malabsorción, puede considerarse esencial. Está disponible en muchos alimentos ricos en proteínas, incluidas las carnes, pero esto puede ser problemático para quienes no consumen carne. En algunas regiones se puede agregar como aditivo alimentario (el número E es E920). Sin embargo, estos aditivos generalmente no son favorecidos por los consumidores, y muchas agencias reguladoras limitan o no permiten que se agreguen aminoácidos a los alimentos.

Una lisozima de huevo de gallina, hidrolizada, se describe en el documento WO 2008/052995 (DSM IP ASSETS BV;) que tiene una relación de Trp/Aminoácido Neutro Grande ("LNAA") de más de 0,15, donde los LNAA son la suma de fenilalanina, leucina, isoleucina y valina en el plasma. Muchos de los péptidos hidrolizados son dipéptidos o tripéptidos que contienen Trp. Una forma de producto comercial de este hidrolizado de lisozima está disponible en DSM Nutritional Products con el nombre "LumiVida". Se ha demostrado que el hidrolizado de lisozima es beneficioso para varios aspectos, incluida la mejora del estado de ánimo y la cognición.

Sería deseable hacer que la Cys que se ha ingerido sea más biodisponible para beneficiar a los tejidos que contienen queratina, como la piel, las uñas y el cabello.

Descripción de las figuras

La FIGURA 1 es un gráfico que muestra los valores de dAUC individuales después del consumo de lumiVida frente a la ingesta de lisozima intacta. Los puntos en la diagonal corresponden a valores iguales en ambos. Los puntos por encima de la diagonal representan individuos con mayor respuesta para lumiVida™ que para lisozima intacta. En general, el dAUC después de la suplementación con lumiVida fue significativamente mayor que después de la ingestión de lisozima intacta (prueba de Wilcoxon, $p = 0,0067$).

La FIGURA 2 es un gráfico que muestra la cinética de las relaciones de Trp/LNAA en plasma tras el consumo de lumiVida (lisozima hidrolizada (diamantes)), lisozima intacta (cuadrados) y una mezcla de lisozima intacta e hidrolizada (triángulos). Se muestran barras de error (error estándar). Los tres tratamientos tienen un contenido de Trp similar.

La FIGURA 3 es un gráfico que muestra la cinética de los valores de cisteína en plasma tras el consumo de lumiVida (lisozima hidrolizada (diamantes)) o lisozima intacta (cuadrados). Se muestran barras de error (error estándar).

La FIGURA 4 es un gráfico que muestra la cinética de los valores de cistina plasmática tras el consumo de lumiVida (lisozima hidrolizada (diamantes)) o lisozima intacta (cuadrados). Se muestran barras de error (error estándar).

La FIGURA 5 muestra la cinética de los valores de glutatión en plasma tras el consumo de lumiVida (lisozima hidrolizada (diamantes)) o lisozima intacta (cuadrados). Se muestran barras de error (error estándar).

La FIGURA 6 es la hoja de datos de LUMIVIDA.

Las FIGURAS 7A y 7B son curvas de tiempo de los cambios en las relaciones Trp/LNAA después de la ingesta de LumiVida (7A) o lisozima intacta (7B) para cada individuo. En ambos gráficos, los individuos se representan con el mismo estilo.

Las FIGURAS 8A y 8B son curvas de tiempo de cambios en las concentraciones plasmáticas de cistina o cisteína después de la ingesta de lumiVida (8A, 8C) o lisozima intacta (8B, 8D) para cada individuo. En ambos gráficos, los individuos se representan con el mismo estilo.

Las FIGURAS 9A y 9B son curvas de tiempo de cambios para las concentraciones plasmáticas de glutatión después de la ingesta de lumiVida (9A) o lisozima intacta (9B) para cada individuo. En ambos gráficos, los individuos se representan con el mismo estilo.

5 Las FIGURAS 10A y 10B muestran los valores individuales de dAUC (corregidos para los valores de línea base) de lumiVida frente a lisozima intacta; se muestran para concentraciones de cisteína (cisteína, 10A) y cistina (cistina, 10B). Los puntos en la diagonal corresponden a valores iguales en ambos. Los puntos por encima de la diagonal representan individuos con mayor respuesta para lumiVida™ que para lisozima intacta. En general, los dAUC no fueron significativamente más altos para lumiVida que el dAUC de lisozima intacta.

10 Las FIGURAS 11A y 11B son los valores individuales de dAUC (corregidos por los valores de línea base) de lumiVida versus lisozima intacta; se muestran para las concentraciones de glutatión (panel izquierdo, 11A) y para las relaciones Trp/LNAA (panel derecho, 11B). Los puntos en la diagonal corresponden a valores iguales en ambos. Los puntos por encima de la diagonal representan individuos con mayor respuesta para lumiVida™ que para lisozima intacta. En general, el dAUC del glutatión no fue significativamente mayor para lumiVida que el dAUC de lisozima intacta; sin embargo, el dAUC de la relación Trp/LNAA con lumiVida fue significativamente mayor que con lisozima intacta.

15 Las FIGURAS 12A y 12B muestran los valores individuales AUC (no corregidos) de lumiVida frente a lisozima intacta para concentraciones de cisteína (12A) y cistina (12B). Los puntos en la diagonal corresponden a valores iguales en ambos. Los puntos por encima de la diagonal representan individuos con mayor respuesta para lumiVida™ que para lisozima intacta. En general, las AUC no fueron significativamente más altas para lumiVida que para la lisozima intacta AUC; sin embargo, la AUC de cistina fue casi significativa en la prueba de Wilcoxon.

20 Las FIGURAS 13A y B muestran los valores AUC individuales (no corregidos) de lumiVida (13A) frente a lisozima intacta (13B) para las concentraciones de glutatión y las relaciones Trp/LNAA. Los puntos en la diagonal corresponden a valores iguales en ambos. Los puntos por encima de la diagonal representan individuos con mayor respuesta para lumiVida™ que para lisozima intacta. En general, las AUC no fueron significativamente más altas para lumiVida que para la lisozima intacta AUC.

25 Las FIGURAS 14A y B muestran los valores C_{máx} individuales de lumiVida versus lisozima intacta para concentraciones de cisteína (14A) y cistina (14B). Los puntos en la diagonal corresponden a valores iguales en ambos. Los puntos por encima de la diagonal representan individuos con mayor respuesta para lumiVida™ que para lisozima intacta. En general, ambas C_{máx} fueron significativamente más altas para lumiVida que la C_{máx} de lisozima intacta.

30 Las FIGURAS 15A y B muestran los valores C_{máx} individuales de lumiVida versus lisozima intacta para glutatión (panel izquierdo; 15A) y las relaciones Trp/LNAA (panel derecho; 15B). Los puntos en la diagonal corresponden a valores iguales en ambos. Los puntos por encima de la diagonal representan individuos con mayor respuesta para lumiVida™ que para lisozima intacta. En general, ambos valores de C_{máx} fueron significativamente más altos para lumiVida que la C_{máx} de lisozima intacta.

Descripción detallada de la invención

35 Se ha descubierto, de acuerdo con esta invención, que un hidrolizado de lisozima de huevo de gallina que comprende péptidos que contienen Trp- tiene la propiedad beneficiosa de incrementar la biodisponibilidad de la cisteína. Este efecto no se observó utilizando lisozima de huevo de gallina intacta. Por tanto, esta invención se refiere a un procedimiento no terapéutico para mejorar el crecimiento, la apariencia y/o el volumen de tejido que contiene queratina que comprende administrar una cantidad de un péptido que contiene Trp para mejorar la piel, el cabello o las uñas a una persona o animal en necesidad o deseo de mejorar la piel, el cabello o las uñas, en el que el péptido que contiene Trp es un hidrolizado de lisozima. A medida que aumentan los niveles de Cys en la sangre, se obtienen diversas ventajas posteriores.

45 En formas preferidas de realización, los péptidos que contienen Trp son di- y/o tripéptidos tales como los que se encuentran en hidrolizados de lisozima comerciales tales como LUMIVIDA® de DSM Nutritional Products, Suiza.

Aumento de los niveles de Cys en sangre

50 En el presente documento se describe el uso no terapéutico de hidrolizado de lisozima para aumentar la cantidad de cisteína en el cuerpo. La cistina es un aminoácido formado por la oxidación de dos moléculas de cisteína (Cys) que se unen covalentemente mediante un enlace disulfuro. El cabello y la piel humanos contienen aproximadamente un 10-14% de cisteína en masa. La cistina se convierte en Cys rápidamente. Debido a la facilidad de la reacción de la cistina a Cys (y viceversa), los beneficios nutricionales de la cistina son los mismos que los de la Cys. Además, la cistina sirve como sustrato para el antiportador cistina-glutamato. Este sistema de transporte, que es altamente específico para Cys y glutamato, se utiliza para aumentar la concentración de cistina dentro de la célula. La forma aniónica de cistina se reduce rápidamente a Cys. Los profármacos de Cys (por ejemplo, acetilcisteína) aumentan la liberación de glutamato en el espacio extracelular.

Por tanto, en el presente documento se describe la administración del hidrolizado de lisozima a una persona que desee aumentar la concentración de cistina en al menos un tejido, o lograr al menos uno de los beneficios de aumentar la cisteína que se describen en este documento.

5 Por tanto, el hidrolizado de lisozima divulgado en la presente, al aumentar los niveles de L-cisteína, tiene otros efectos en todo el cuerpo. Por ejemplo, puede ayudar a reducir los efectos de alergias, acné, piel dañada por el sol, bronquitis crónica y enfisema. Para las reacciones alérgicas que resultan en la producción de flema, la presencia de cisteína puede romper los enlaces que hacen que el colágeno se aglomere en el moco; las secreciones son más líquidas y, por tanto, más fáciles de expulsar.

10 El hidrolizado de lisozima divulgado en este documento ayuda a proteger contra el daño de la piel por el sol. La cisteína ayuda a formar enzimas que mantienen la actividad de p53. La vía p53 inicia una serie de eventos que resultan en una célula potencialmente cancerosa que sufre apoptosis. La cisteína también es importante para la formación de caspasas, que descomponen las células muertas.

El hidrolizado de lisozima divulgado en el presente documento también es útil en el tratamiento o la mejora del acné, preferiblemente junto con vitamina B5 (ácido pantoténico). La cisteína ayuda al cuerpo a absorber la vitamina B5.

15 [0014] Por tanto, en el presente documento se divulga la administración del hidrolizado de lisozima a una persona que desee aumentar la concentración de cistina en su cabello y/o piel.

Producción de queratina

20 Como Cys es un aminoácido que es clave en la fabricación de la proteína queratina, otro aspecto de esta invención es un procedimiento no terapéutico para mejorar la producción de queratina al proporcionar una cantidad eficaz para mejorar la queratina a partir de hidrolizado de lisozima de huevo de gallina que comprende dipéptidos y tripéptidos que contienen Trp a una persona que desee mejorar la apariencia de su cabello, piel, cutícula, uñas u otro tejido que contenga queratina. Otra forma de realización de esta invención es el uso no terapéutico de hidrolizado de lisozima de huevo de gallina para mejorar la fabricación de queratina y, de ese modo, mejorar la apariencia de piel, cabello, cutículas, uñas u otros tejidos que contienen queratina. Otra forma de realización de esta invención es el uso no
25 terapéutico de hidrolizado de huevo de gallina para preparar un nutracéutico para mejorar la fabricación de queratina en una persona que experimenta una deficiencia de queratina.

Mejora de la apariencia de estructuras que contienen queratina

30 Otro aspecto de esta invención es un procedimiento no terapéutico para mejorar la apariencia del cabello, piel, cutículas y/o uñas que comprende proporcionar una cantidad eficaz para mejorar el cabello, la piel, la cutícula o las uñas de hidrolizado de lisozima de huevo de gallina que comprende di- y tripéptidos que contienen Trp a una persona que desea realzar la apariencia de su cabello, piel, cutículas o uñas.

35 Esta invención también se refiere al uso no terapéutico de hidrolizado de lisozima de huevo de gallina que comprende dipéptidos y tripéptidos que contienen Trp para una persona que desee mejorar el aspecto de su cabello, piel, cutículas o uñas. También se refiere al uso no terapéutico de hidrolizado de lisozima de huevo de gallina que comprende di y tripéptidos que contienen Trp para mejorar la producción de queratina. También está dirigido al uso no terapéutico de un hidrolizado de lisozima de huevo de gallina en la fabricación de un nutracéutico, alimento o complemento alimenticio que aumenta la cantidad de Cys en el suero sanguíneo, mejora la biosíntesis de queratina o mejora la apariencia del cabello, piel, o uñas.

Kits

40 Otro aspecto de esta invención es un procedimiento de comercialización de un hidrolizado de lisozima que comprende proporcionar un kit que comprende:

a) múltiples dosis de hidrolizado de lisozima; y

b) información que informe al consumidor de los beneficios para la salud de dicho hidrolizado de lisozima seleccionado del grupo que consiste en:

45 beneficios para el cabello, beneficios para la piel y beneficios para las uñas,

c) información adicional opcional seleccionada del grupo que consta de:

regímenes de dosificación, fechas de vencimiento y beneficios adicionales no mencionados en b).

Dosificación

Dosificación

Las dosis para aumentar la cisteína, cisteína en la sangre deben ser de al menos 0,5 gramos de hidrolizado por día para un adulto, y pueden extenderse hasta grandes dosis, como más de 10 gramos por día. La cantidad preferida es de 0,5 gramos a aproximadamente 7,5 gramos de hidrolizado por día, de preferencia aproximadamente desde 1 gramo a aproximadamente 6 gramos por día.

5 El hidrolizado de proteína se consume una o dos veces al día para lograr efectos agudos. En otra forma de realización preferida, el hidrolizado de proteína se consume 2 veces al día, con un intervalo de al menos 6 horas entre dosis, y preferiblemente no más de 18 horas entre dosis. En formas de realización más preferidas, las dosis se consumen a intervalos de aproximadamente 12 horas, tal como temprano en la mañana y temprano en la noche. También se pueden consumir dosis adicionales por día si se desea, tales como 2-8 gramos por día de hidrolizado de proteína que contiene Trp, y se puede ver que estas dosis tienen beneficios adicionales. Otra dosis es de hasta 6 gramos por día. Otra dosis es de hasta 8 gramos por día. Otra dosis es menos de 6 gramos por día, pero al menos 1 gramo por día. También se conciben dosis de 1 a 3 gramos por día. Las dosis de más de 10 gramos de hidrolizado de proteína que contiene Trp por día también son efectivas, pero no se prefieren ya que puede haber problemas de sabor.

15 En otra forma de realización, esta forma de dosificación también se puede administrar varias veces al día durante un período de tiempo prolongado, de manera que la persona reciba 10-100 mg de Trp al día, preferiblemente 25-70 mg de Trp al día. En una forma de realización preferida, la persona recibe 1 gramo de hidrolizado por día, que contiene un total de 62-64 mg de Trp. En otra forma de realización preferida, la persona recibe 0,5 gramos de hidrolizado de Trp por día, que contiene un total de 20-26 mg de Trp. En otra forma de realización, la persona recibe múltiples de estas dosis de modo que la cantidad total de Trp por día esté entre 25-1000 mg, preferiblemente 50-800 mg y más preferiblemente 60-600 mg.

25 Además de la rutina diaria de cuidado de la belleza, el cabello y las uñas también deben recibir los nutrientes adecuados para mantenerse fuertes y saludables. El cabello sano es naturalmente brillante y fuerte. Los nutrientes en los folículos pilosos y el bulbo son necesarios para el desarrollo y crecimiento de un cabello sano, y para una fuerte estructura, brillo, color y elasticidad del cabello. El crecimiento saludable del cabello requiere una amplia variedad de micronutrientes y vitaminas. El cabello refleja el estado general del cuerpo y las deficiencias nutricionales.

Las uñas fuertes también requieren los micronutrientes adecuados. Las uñas blandas o quebradizas pueden revelar deficiencias nutricionales antes de que aparezcan los síntomas en el cuerpo. Las uñas están hechas de una proteína, queratina, y crecen continuamente, por lo que un suministro continuo de los ingredientes correctos desde el interior apoya la estructura de la uña y promueve el crecimiento de uñas atractivas y fuertes.

30 El cabello hermoso es naturalmente abundante, fuerte y brillante. La salud del cabello depende del suministro de sangre, la circulación, las hormonas, los niveles de estrés y la nutrición. Una textura de cabello fuerte requiere nutrientes esenciales para apoyar el crecimiento de las células en las raíces del cabello y proporcionar un cabello lleno de vigor y vitalidad. Los materiales para la construcción del cabello, como las vitaminas y otros micronutrientes, apoyan los procesos biológicos que proporcionan el mantenimiento de una fuerte textura y brillo del cabello, firmeza y elasticidad del cabello.

40 La queratina es un componente estructural importante de la piel, el cabello y las uñas. Los filamentos de queratina abundan en los queratinocitos de la capa cornificada de la epidermis; estas son células que se han sometido a queratinización. Además, los filamentos de queratina están presentes en las células epiteliales en general. Las queratinas, también descritas como citoqueratinas, son polímeros de filamentos intermedios de tipo I y tipo II. La molécula de queratina se mantiene unida por enlaces de hidrógeno intra- e intermoleculares. Además, las queratinas tienen grandes cantidades del aminoácido cisteína que contiene azufre, necesario para los puentes de disulfuro que confieren resistencia y rigidez adicionales mediante enlaces permanentes térmicamente estables. Las queratinas más flexibles y elásticas del cabello tienen menos puentes de disulfuro entre cadenas que las queratinas de las uñas de los mamíferos.

45 El cabello humano tiene aproximadamente un 14% de cisteína. El cabello y otras α -queratinas consisten en hebras de proteína únicas enrolladas de modo α -helicoidal (con enlaces H intracatenarios regulares), que luego se retuercen en cuerdas superhelicales que pueden enrollarse más. El aminoácido cisteína que contiene azufre se encuentra naturalmente en los alimentos y también puede ser fabricado por el cuerpo a partir del aminoácido metionina.

50 En la producción de cisteína, la metionina se convierte en S-adenosil metionina (SAM), que luego se convierte en homocisteína. La homocisteína luego reacciona con la serina para formar cisteína.

Ingesta diaria recomendada (DRI) *

- todos los individuos de 1 año de edad o mayores deben consumir 25 miligramos de cisteína más metionina (combinadas) por cada gramo de proteína alimentaria.

55 Recomendación para cada grupo de edad y sexo, asumiendo la ingesta de proteínas a nivel de RDA y el 50% de las necesidades de aminoácidos que contienen azufre suministradas por la cisteína:

- Niños de 1 a 3 años: 163 mg de cisteína

- Niños de 4 a 8 años: 238 mg de cisteína
 - Hombres de 9 a 13 años: 425 mg de cisteína
 - Hombres de 14 a 18 años: 650 mg de cisteína
 - Hombres de 19 años en adelante: 700 mg de cisteína
- 5
- Mujeres de 9 a 13 años: 425 mg de cisteína
 - Mujeres de 14 años en adelante: 575 mg de cisteína
 - Mujeres embarazadas o lactantes: 888 mg de cisteína

El hidrolizado de proteína de esta invención puede sustituir diversas fuentes naturales de cisteína, que incluyen estas:

Alimento	g de cisteína por 100 g	g de cisteína por porción
Huevo, entero	0,272	0,136 (~ 50g)
Huevo, clara	0,287	0,095 (~ 33g)
Yema de huevo	0,264	0,045 (~ 17g)
Leche entera grasa completa	0,030	0,073 (~240ml)
Yogurt	0,032	0,036 (~113g)
Carne de pollo, con piel, cocida, frita	0,393	1,014 (~ 258 g, retirados hueso y piel)
Avena	0,408	0,163 (40g)
Repollitos de Bruselas cocidos, hervidos, escurridos, sin sal	0,016	0,012 (78g)
Brócol cocido, hervido, escurrido, sin sal	0,031	0,024

- 10 Los péptidos bioactivos en el hidrolizado de lisozima de huevo de acuerdo con esta invención proporcionan aminoácidos altamente biodisponibles para nutrir la piel, el cabello y las uñas. Un alto contenido de cisteína en el hidrolizado de lisozima de huevo de acuerdo con esta invención (6,2%) proporciona componentes básicos para la queratina, el componente estructural clave de la piel, el cabello y las uñas. Por tanto, el hidrolizado de lisozima de huevo según esta invención puede servir como una valiosa fuente dietética para satisfacer las ingestas diarias recomendadas. Esto es especialmente valioso para las personas que hacen dieta y los vegetarianos que carecen de fuentes importantes de cisteína.
- 15

2 g de hidrolizado de lisozima de huevo de acuerdo con esta invención proporcionan el 13% del DRI para cisteína.

La cisteína del hidrolizado de lisozima de huevo de acuerdo con esta invención es biodisponible. Existe una necesidad de los consumidores de suplementos de cisteína, especialmente para los vegetarianos:

- 20 "Soy vegetariana(o) y no como productos de origen animal. Como tengo que controlar mi dieta todos los días para mantenerme delgada(o), siempre estaba buscando un producto que me ayudara a obtener suficientes nutrientes para mantener mi piel sana y mi cabello brillante".

- 25 Por tanto, otra forma de realización de esta invención es el uso de hidrolizado de lisozima para vegetarianos que ingieren productos a base de huevo por los diversos beneficios divulgados en este documento, tales como aumentar los niveles de cisteína y glutatión y mejorar la apariencia de la piel, uñas y/o cabello. Otro aspecto de esta invención es un procedimiento para complementar la dieta de un vegetariano que ingiere huevos que necesita potenciar la cisteína que comprende la administración de hidrolizado de lisozima de huevo.

Los siguientes ejemplos no limitantes se presentan para ilustrar más la invención.

Ejemplo 1

30 Ensayo clínico

Razón fundamental:

- 35 lumiVida™ es una forma hidrolizada de lisozima, una proteína del huevo de gallina. Se ha demostrado que lumiVida™ tiene propiedades para mejorar el estado de ánimo debido al hecho de que es rico en triptófano (Trp), un aminoácido que es un sustrato para la síntesis de serotonina. En el estudio actual, deseamos comparar lisozima intacta e hidrolizada en términos de niveles plasmáticos de Trp (y los otros miembros de la clase de aminoácidos neutros grandes, LNAA) en humanos durante un período postprandial de cuatro horas. Además, los aminoácidos cisteína, el di-aminoácido, la cistina que se forma por la oxidación de dos cisteínas que dan como resultado un puente de disulfuro y el tripéptido glutatión que contiene cisteína se investigaron durante el mismo período de tiempo en sujetos que consumían lumiVida™ o lisozima intacta.

Objetivo:

- Evaluar la cinética de tiempo de las proporciones plasmáticas de Trp/LNAA después de un solo tratamiento de (1) lumiVida™, (2) lisozima intacta o (3) una mezcla de 30/70 moles por ciento de Trp de lumiVida™ y lisozima intacta.
- Evaluar también la cinética plasmática de cisteína, cistina y glutatión después del consumo de lumiVida™ o lisozima intacta.

Diseño del estudio:

El estudio se ha realizado de acuerdo con un diseño cruzado, doble ciego, aleatorizado.

Población de estudio:

15 voluntarios sanos entre 18 y 70 años de ambos sexos.

Intervención:

Las bebidas contenían

- 6 g de lumiVida™,
- 6 g de lisozima intacta o
- una combinación de 30 por ciento molar de Trp en forma de lumiVida™ y 70 por ciento molar de Trp en forma de lisozima.

Principales criterios de valoración del estudio:

- $T_{m\acute{a}x}$ de la Trp/LNAA - curva de tiempo después del consumo de los respectivos compuestos de estudio
- $AUC_{0-240min}$ de Trp plasmático después del consumo de lumiVida™, lisozima intacta o la combinación
- $AUC_{0-240min}$ de cisteína, cistina y glutatión después del consumo de lumiVida™ o lisozima intacta
- $C_{m\acute{a}x}$ de cisteína, cistina y glutatión después del consumo de lumiVida™ o lisozima intacta

Diseño, población y tratamiento

- Diseño:

El estudio siguió un diseño cruzado, aleatorizado, doble ciego. No se consideró necesario placebo, ya que se tomaron medidas de línea de base (t = 0) en cada día del estudio. Además, la pregunta principal de la investigación se relaciona con la comparación de diferentes tratamientos activos.

- Población:

15 sujetos sanos de sexo masculino o femenino entre 18 y 70 años que dieron su consentimiento informado por escrito.

- Criterio de exclusión:

- Mujeres embarazadas o sexualmente activas en edad fértil que no estén usando un procedimiento anticonceptivo médicamente aceptado.
- Enfermedad crónica y actual, a discreción del investigador
- Historia de trastornos psiquiátricos;
- Uso de "inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina" (ISRS);
- Uso de suplementos dirigidos al sistema nervioso central, como suplementos que contienen triptófano, efedrina o verruga de San Juan
- Alergia al huevo
- Abuso de drogas
- Participación en cualquier otro estudio que involucre productos en investigación o comercializados concomitantemente.
- Intolerancia a los edulcorantes artificiales

- Cualquier (historial de) enfermedad gastrointestinal que interfiriera con la función gastrointestinal, a discreción del investigador.
- Uso de medicamentos dirigidos al tracto gastrointestinal, como antiácidos

- Producto en investigación:

5 Las bebidas contenían 6 g de lumiVida™, 6 g de lisozima intacta o una combinación de 30 por ciento molar de Trp en forma de lumiVida™ y 70 por ciento molar de Trp en forma de lisozima. Las tres condiciones diferentes se presentaron como bebidas estériles en botellas con pajitas. Todas las bebidas contenían 0,10 g de edulcorante (acesulfamo) y se llenaron con agua corriente para alcanzar un volumen de bebida de 300 ml.

10 Lisozima: proteína derivada del huevo de gallina. La lisozima es rica en Trp. Es una proteína alimentaria de origen natural que no se ha alterado de ninguna manera. De hecho, el contenido total de aminoácidos de la lisozima la convierte en una proteína nutricionalmente muy completa.

15 lumiVida™: Lisozima hidrolizada. lumiVida™ es una forma hidrolizada de lisozima. La hidrólisis de péptidos se realiza con frecuencia en la industria alimentaria para reducir la alergenicidad (por ejemplo, para fórmulas alimentarias para lactantes), para mejorar las características de aplicación (por ejemplo, los hidrolizados producen soluciones transparentes en agua, a diferencia de la mayoría de las proteínas intactas) o para facilitar la digestión (por ejemplo, para la nutrición deportiva). La hidrólisis implica un tratamiento enzimático con enzimas de grado alimenticio. Como tal, los hidrolizados tienen un estado GRAS (generalmente reconocido como seguro) en los EE. UU. y no se consideran alimentos nuevos según la legislación alimentaria de la UE. Se adjunta una hoja de datos del producto como FIGURA 6.

20 Procedimientos de estudio

El estudio se realizó de acuerdo con un diseño cruzado, aleatorizado, doble ciego. Los períodos de lavado entre tratamientos fueron de al menos tres días. No se requirió placebo ya que los valores de línea de base se obtuvieron antes del consumo de cada producto y no se espera que los niveles de aminoácidos plasmáticos estén sujetos a un efecto placebo. El estudio estuvo compuesto por cuatro visitas. En la primera visita después de firmar el formulario de consentimiento informado, se verificaron los criterios de elegibilidad y se programaron citas para las sesiones experimentales de la mañana.

30 Durante tres sesiones matutinas experimentales, los sujetos visitaron el sitio entre las 8 y las 9 am, después de haber ayunado durante al menos 8 horas. Se insertó una cánula flexible para extracción de sangre en su antebrazo no dominante. Luego ingirieron una de las bebidas experimentales. Antes y en t = 15, 30, 60, 90, 120, 180, 210 y 240 minutos después de la ingestión, se han tomado muestras de sangre para medir el efecto de las diferentes fuentes de proteínas sobre la relación plasmática Trp / LNAA y sobre alguna otra concentración de aminoácido. No se permitió la ingesta de ningún alimento o bebida que no fuera agua durante estos 240 minutos.

35 Se han tomado muestras de sangre por el CRO "Ampha BV", Nijmegen (Ampha BV, Toernooiveld 220, 6525 EC Nijmegen). Las mediciones de aminoácidos se han realizado en DSM Food Specialties de acuerdo con el procedimiento de análisis del documento interno No C2529. Este procedimiento describe un procedimiento de HPLC para la determinación de aminoácidos. El principio del ensayo se basa en la separación quiral de aminoácidos. Se emplea la detección basada en fluorescencia.

Mediciones de plasma

40 Para la determinación de Trp y LNAA en sangre: se recogieron aproximadamente 5 ml de sangre en un tubo de sangre con heparina de litio, se balanceó y se puso inmediatamente en hielo. Posteriormente se centrifugó la muestra y se mezcló plasma de 750 µl con 5-SSA (4 mg/ 100 ml de plasma). Estas soluciones se centrifugaron a 13000 RPM durante 5 minutos y se añadieron 40µl de patrón interno a 20 µl de sobrenadante (160 mg de ácido alfa-aminoadípico en 2 litros de HCl de 1,2 mM). Se añadieron 50µl de regulador de pH de borato (incluido en el kit Waters AccQ.Tag art No. 186003836), 40µl de NaOH de 0,4 M y 20µl de reactivo (incluido en el kit Waters AccQ.Tag art No. 186003836), se mezclaron y se calentaron durante 10 minutos a 55 °C. Posteriormente, se inyectó 1 µl en la columna y se procedió al análisis como se describe en Boogers et al, Journal of Chromatography A, 1 189 (2008) 406-409.

50 Para la determinación de cisteína, cistina y glutatión en la sangre: las muestras de plasma sanguíneo se centrifugaron durante 10 min a 14000 RPM. Se mezclaron 10 µl de sobrenadante de plasma sanguíneo con 90 µl de HCl de 0,1 N y 100 µl de solución estándar de componentes internos marcados (mezcla de cisteína marcada ((U-13C3; 15N), CIL, CNLM-3871-PK), cistina (3, 3'- 13C), CIL, CLM-520-0) y glutatión ((Glicina-13C2; 15N), CIL, CLM-6245). Después de mezclar, se inyectaron 2 µl en la columna.

Consideraciones estadísticas

Estadísticas descriptivas

Las muestras de plasma de cada punto temporal se analizaron para determinar los niveles de Trp y LNAA, es decir, la suma de Val, Ile, Leu, Tyr y Phe. La relación resultante Trp/LNAA se representó frente al tiempo posterior al consumo del producto de intervención. Las diferencias entre las áreas resultantes bajo la curva Trp/LNAA - tiempo (Trp/LNAA AUC) de los tratamientos se han probado estadísticamente.

5 Las muestras de plasma de cada punto de tiempo se han analizado adicionalmente para determinar los niveles de cisteína, cistina y glutatión. Estas concentraciones se transfirieron en función del tiempo posterior al consumo del producto de intervención, lisozima intacta y lumiVida, pero no la mezcla. Se calculó el área resultante bajo la curva y se comparó estadísticamente con los diferentes productos de intervención. También se calculó la $C_{m\acute{a}x}$ y se comparó estadísticamente con los diferentes productos de intervención.

10 Estadística univariante

La importancia del efecto del tratamiento sobre la $T_{m\acute{a}x}$ y las de curvas de Trp/LNAA - tiempo de AUCs plasmáticas se evaluó mediante pruebas t de Student. Los parámetros cisteína, cistina y glutatión se evaluaron estadísticamente mediante la prueba de Wilcoxon con un umbral de significancia de $p < 0,05$.

Resultados

15 **Relaciones TRP/LNAA**

En la Figura 2 se representa la relación Trp/LNAA plasmática como variable de tiempo para los tres tratamientos diferentes. Todos los tres tratamientos produjeron un aumento de la relación Trp/LNAA. El aumento más rápido (en 15 minutos) y más pronunciado se observó después del consumo del hidrolizado de lisozima (lumiVida™). La lisozima intacta produjo un aumento mucho más lento de la relación Trp/LNAA, pero también la disminución de la relación Trp/LNAA con el tiempo fue mucho más lenta. La mezcla de lisozima intacta e hidrolizada produjo un resultado intermedio. En un análisis de "medidas repetidas", todos los tres tratamientos muestran un tratamiento significativamente diferente por interacción de tiempo ($P < 0,001$), lo que indica que las tres curvas tienen formas significativamente diferentes. Es de destacar que todos los tres productos producen valores AUC similares que indican que tanto el hidrolizado de lisozima como la lisozima intacta se absorben en la sangre en una medida similar (Tabla 1). La dAUC se calculó restando la AUC de línea de base (línea de base*240 min) de la AUC original. lumiVida™ tenía una dAUC significativamente mayor que la lisozima intacta (prueba de Wilcoxon, valor $p = 0,0067$, Figura 1). Para la AUC original no hubo diferencias significativas entre lumiVida™ y lisozima intacta

Tabla 1

	dAUC	SD
lumiVida	9,4	2,9
Lisozima intacta	7,3	2,9
Mezcla	8,4	4,2

30 Se muestran la media y la desviación estándar de la AUC corregida para la línea de base de las relaciones de Trp/LNAA.

Parámetros de otros aminoácidos

Los niveles plasmáticos de cisteína, cistina y glutatión como un curso de tiempo para lumiVida™ y la lisozima intacta se representan en la FIGURA 3, FIGURA 4 y FIGURA 5. Los parámetros se evaluaron estadísticamente mediante la prueba de Wilcoxon con un umbral de significancia de $p < 0,05$. Los valores de la línea de base no difirieron significativamente entre la lisozima intacta y el tratamiento con lumiVida™ para cisteína, cistina y glutatión (Tabla 2, a continuación). El área bajo la curva de 0 a 240 minutos no difirió significativamente entre los tratamientos, aunque numéricamente, los tres parámetros fueron más altos en lumiVida™ (Tabla 2, a continuación). La $C_{m\acute{a}x}$ fue significativamente más alta para lumiVida™ en comparación con la lisozima en todos los tres parámetros (cisteína $p = 0,0039$, cistina $p = 0,0034$ y glutatión $p = 0,0053$) (Tabla 2). El perfil cinético aumentó más rápidamente con lumiVida™ que con lisozima, lo que resultó en una $C_{m\acute{a}x}$ más alta. Los datos originales se recopilan en las FIGURAS 7-15.

Discusión

En este estudio proporcionamos datos de que la ingesta del hidrolizado de lisozima lumiVida™ es más beneficiosa para aumentar las relaciones de Trp/LNAA que la proteína intacta. Pudimos demostrar que el aumento de esta relación en el plasma sanguíneo es mayor (valores de $C_{m\acute{a}x}$ más altos con lumiVida™ que con la lisozima intacta). Además, las AUC corregidas de la línea de base, que tienen en cuenta la variación diaria (individual) de la línea de base, fueron mayores después de la ingesta de lumiVida™ que después de la lisozima intacta. Estos hallazgos indican que el Trp de la proteína hidrolizada lumiVida™ se puede absorber más rápidamente en el sistema sanguíneo y en mayor medida que con la lisozima intacta. Como lumiVida™ y lisozima intacta contienen la misma cantidad de Trp, se podría esperar que la exposición de Trp en el sistema sanguíneo sea similar. Sin embargo, como nuestros datos muestran que las dAUC son más altas con lumiVida™ que con la lisozima intacta, algo de Trp de la lisozima intacta no entrará al sistema sanguíneo. Como se necesita más tiempo para digerir la lisozima intacta, las bacterias intestinales pueden absorber

los fragmentos hidrolizados y, por lo tanto, es posible que ya no estén disponibles para el sistema sanguíneo. La mezcla de lumiVida™ con lisozima intacta obtuvo una respuesta intermedia.

Otro hallazgo fue el aumento significativo de los valores plasmáticos de $C_{máx}$ de cisteína, cistina y glutatión después de la ingesta de lumiVida™. Estos aumentos también reflejan el aumento significativo de las relaciones Trp/LNAA informadas anteriormente. Las AUC plasmáticas de estos aminoácidos fueron muy similares y no fueron estadísticamente diferentes de manera significativa después de la ingesta de lumiVida™ y lisozima intacta. Esto refleja que los aminoácidos se absorben en la sangre más rápidamente después del hidrolizado lumiVida™ que después de la ingesta de lisozima intacta. Sin embargo, la exposición total de aminoácidos a la sangre es similar con ambos compuestos, ya que la AUC es similar. Suponiendo que la eficacia depende de alcanzar un nivel umbral mínimo de un determinado aminoácido en la sangre para iniciar su efecto, se espera entonces que la ingesta de lumiVida™ sea más beneficiosa que la ingesta de la lisozima intacta.

Tabla 2

	Parámetro (promedio)	lumiVida	lisozima
Cisteína	$C_{máx}$ (SD)	7,8 (2,4)*	5,3 (1,3) *
	Valor de línea de base (SD)	3,3 (0,8)	3,3 (0,7)
	AUC (SD)	1073,3 (249,0)	999,7 (244,4)
	N	15	14
Cistina	$C_{máx}$ (SD)	61,0 (8,1) *	50,4 (6,7) *
	Valor de línea de base (SD)	48,3 (8,1)	44,4 (8,6)
	AUC (SD)	12082,9 (2019,2)	10726,7 (1769,1)
	N	15	15
Glutatión	$C_{máx}$ (SD)	1,8 (0,6) *	1,4 (0,4) *
	Valor de línea de base (SD)	1,0 (0,4)	1,0 (0,4)
	AUC (SD)	304,0 (96,0)	255,7 (90,8)
	N	15	14

Valores promedio de $C_{máx}$, valores de línea de base y AUC se indican para cisteína, cistina y glutatión.

* valor $p < 0.05$

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento no terapéutico para mejorar el crecimiento, la apariencia y/o el volumen de tejido que contiene queratina que comprende administrar una cantidad de un péptido que contiene Trp para mejorar la piel, el cabello o las uñas a una persona o un animal que lo necesite, o desee mejorar la piel, el cabello o las uñas, en el que el péptido que contiene Trp es un hidrolizado de lisozima.
2. El procedimiento no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende administrar de 0,5 gramos a 7,5 gramos de hidrolizado por día.
3. El procedimiento no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende administrar desde 1 gramo hasta aproximadamente 6 gramos por día.
- 10 4. Uso no terapéutico de un péptido que contiene Trp que es un hidrolizado de lisozima para mejorar el crecimiento, la apariencia y/o el volumen de los tejidos que contienen queratina, incluidos la piel, el cabello o las uñas.
5. Uso no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende administrar de 0,5 gramos a 7,5 gramos de hidrolizado por día.
- 15 6. El uso no terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, que comprende administrar de 1 gramo a aproximadamente 6 gramos por día.
7. Un péptido que contiene Trp que es un hidrolizado de lisozima para su uso en un procedimiento para mejorar el crecimiento, apariencia y/o volumen de tejidos que contienen queratina en una persona o un animal que padece una condición de salud adversa debido a la falta de queratina suficiente.
- 20 8. El péptido que contiene Trp que es hidrolizado de lisozima para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la persona que experimenta una deficiencia de queratina se selecciona del grupo que consiste en trastornos por fragilidad de la piel y esteatocistoma múltiple.

Figura 1

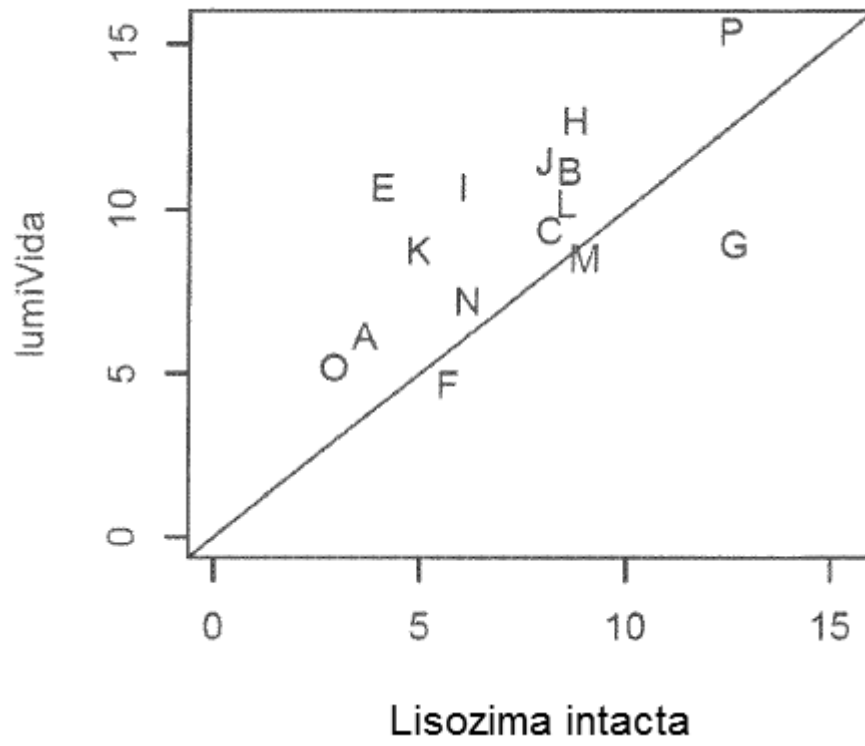


Figura 2

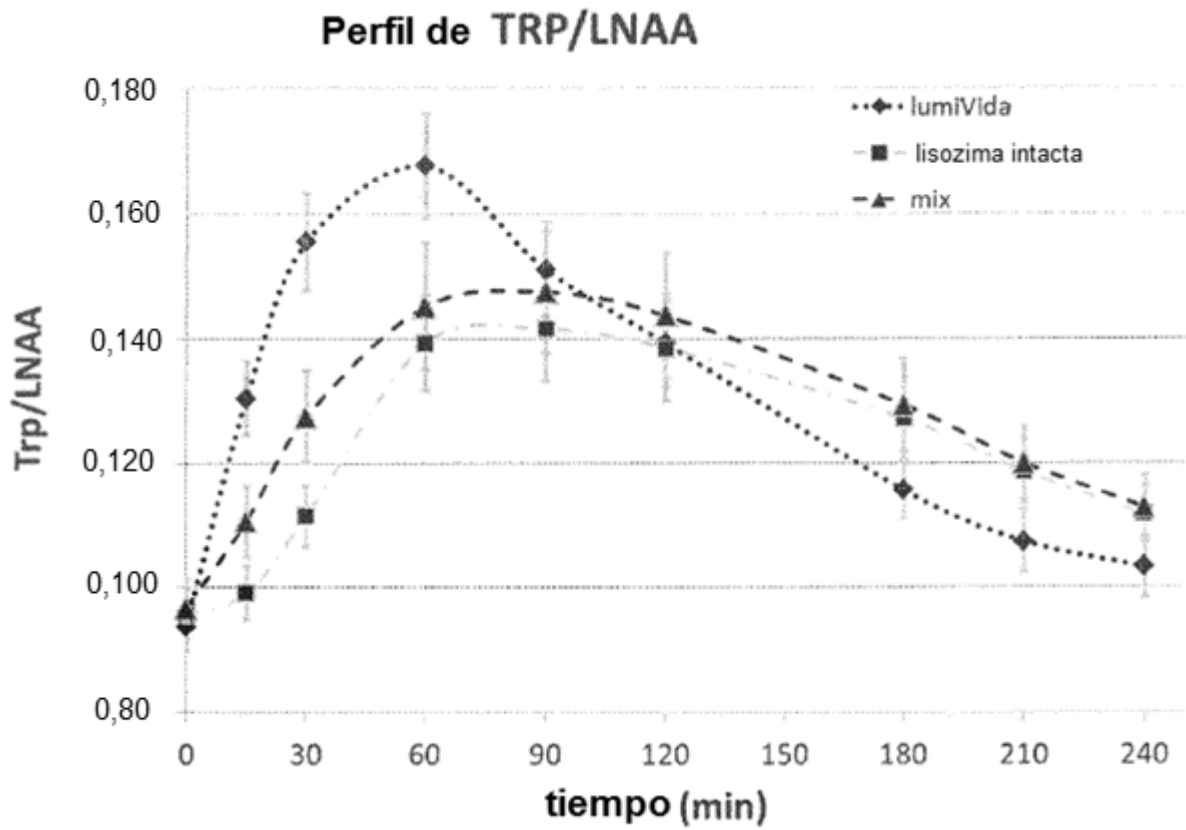


Figura 3

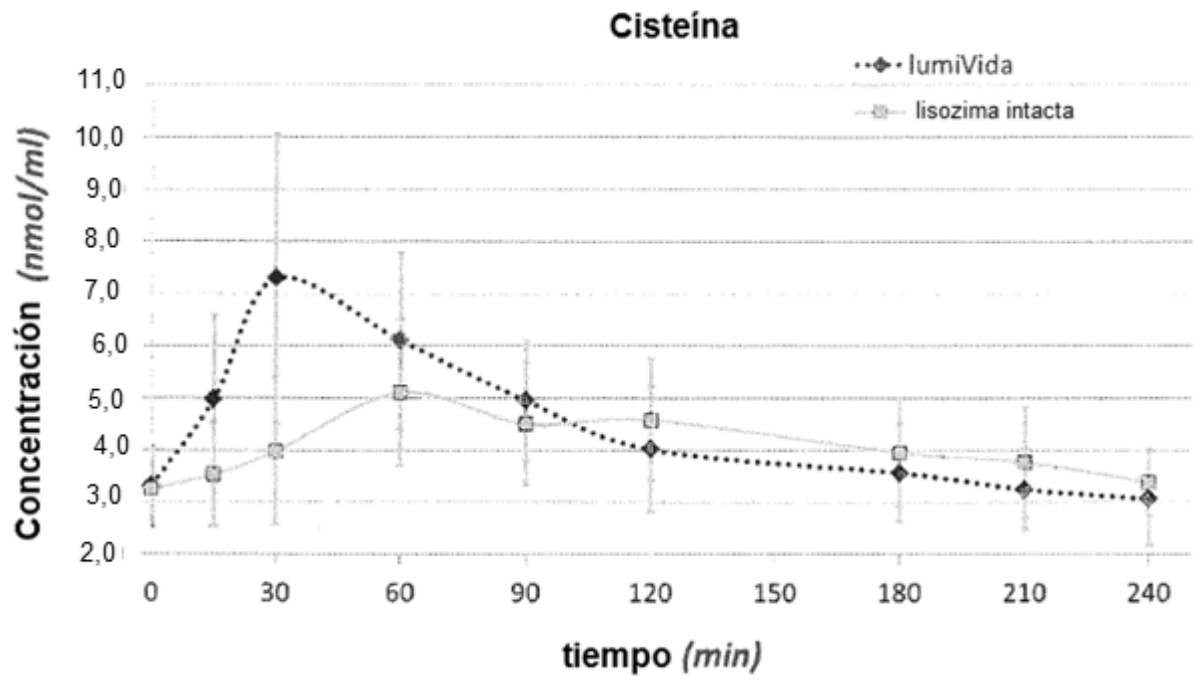


Figura 4

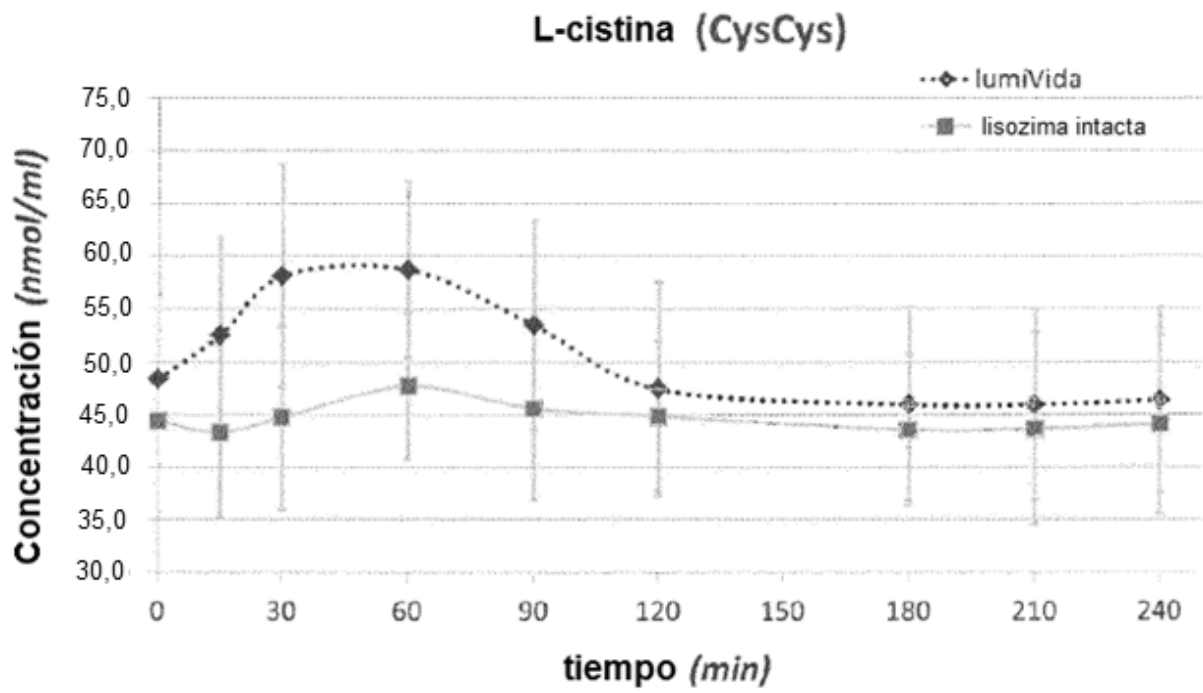


Figura 5

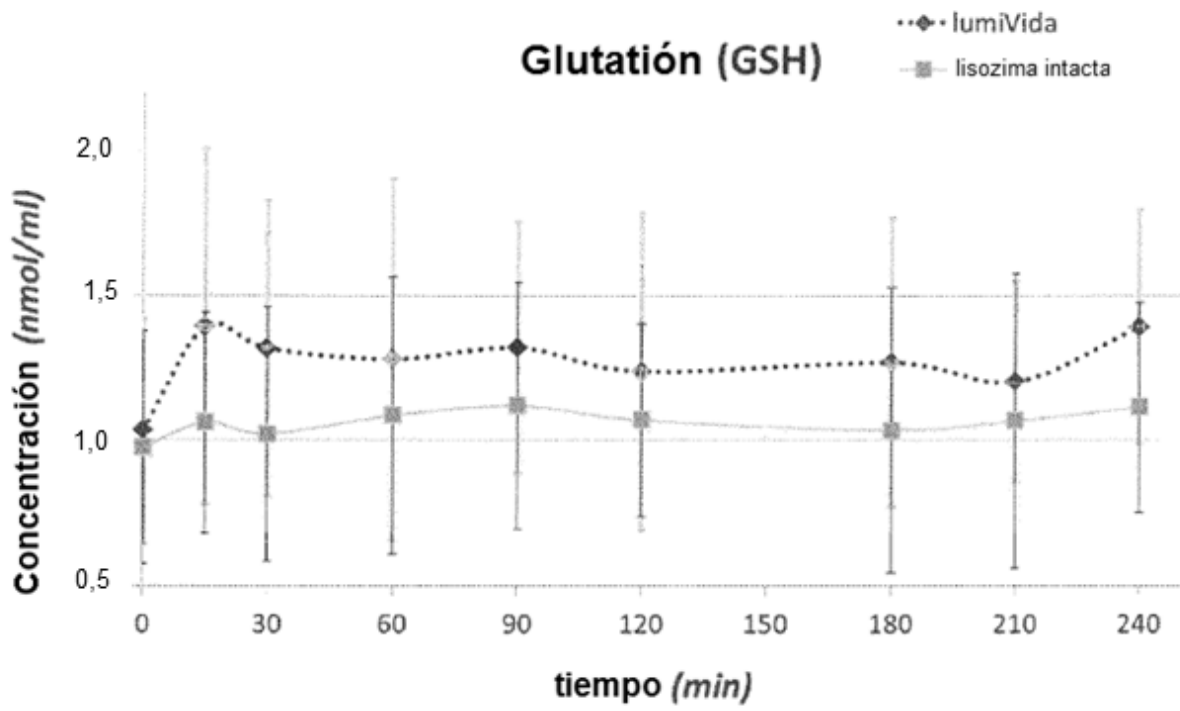


Figura 6

DSM Nutritional Products



Hoja de datos del producto

lumivida™

5 Descripción

lumivida™ es un hidrolizado de proteína derivado de una proteína de clara de huevo. Contiene una cantidad mínima garantizada de péptidos que contienen triptófano bioactivo en una relación controlada con respecto a aminoácidos neutros grandes (LNAA). La relación Trp:LNAA controlada supone una alta ingesta de Trp hacia el cerebro.

10 Identificación de producto

Código de producto: xxx

Especificaciones

Apariencia:	polvo
Color:	blanco a amarillo claro
15 Proteína (en material anhidro)	>= 80%
Trp (% en masa de proteína)	>= 6,5%
Tyr (% en masa de proteína)	>= 3,5%
Relación Trp/LNAA (molar)	0,18 – 0,20
Humedad	< 5,0%
20 Cenizas	< 10%
Sodio	< 6%
Pureza microbiológica:	
• Recuento total microbiano aeróbico	< 10 ³ CFU/G
• Recuento total de combinado de levaduras/moho	<102 CFU/g
25 • Enterobacterias	< 10 CFU/g
• Salmonella ssp	negativo en 25 g
• Escherichia coli	negativo en 10 g
• Staphylococcus aureus	negativo en 10 g
• Pseudomonas aeruginosa	negativo en 10 g

30 Estabilidad y almacenamiento

lumivida™ mantiene su contenido de proteína declarado durante al menos 24 meses desde la fecha de fabricación almacenado en el recipiente original sin abrir y a una temperatura por debajo de 25 °C. La fecha de "usar mejor antes de" se imprime en la etiqueta.

Aplicaciones

35 Especialmente adecuado para aplicaciones alimentarias y suplementos dietarios

PDS Versión 01 Imunivida™	2011-01-03
pdsxxx_01_lumivida.doc	nuevo
	½

Figura 7

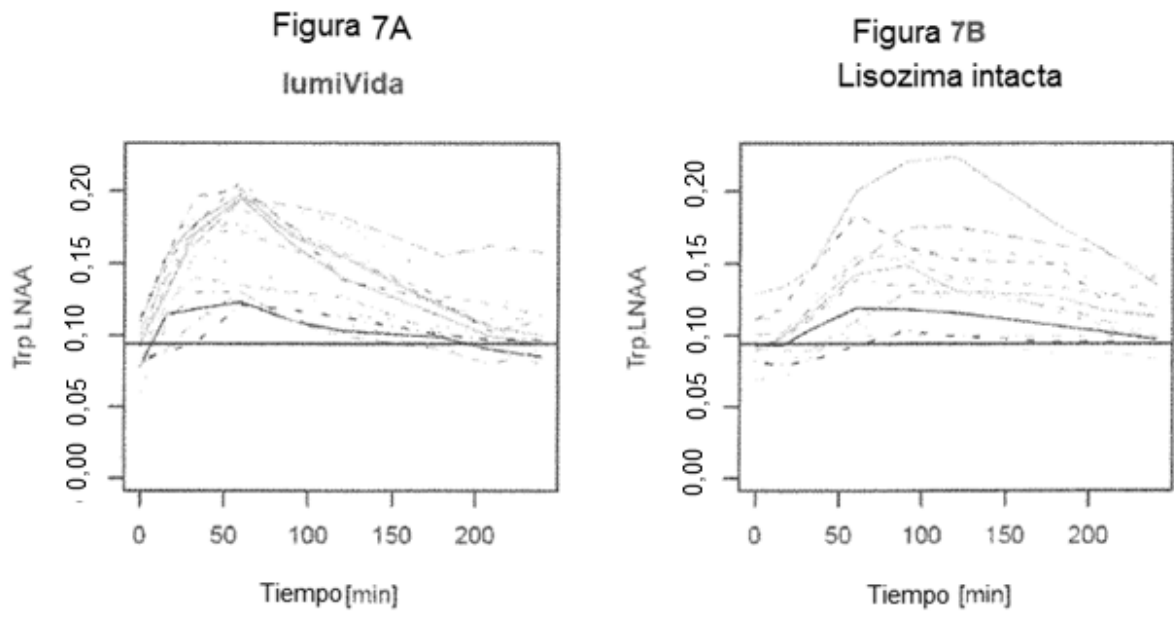


Figura 8

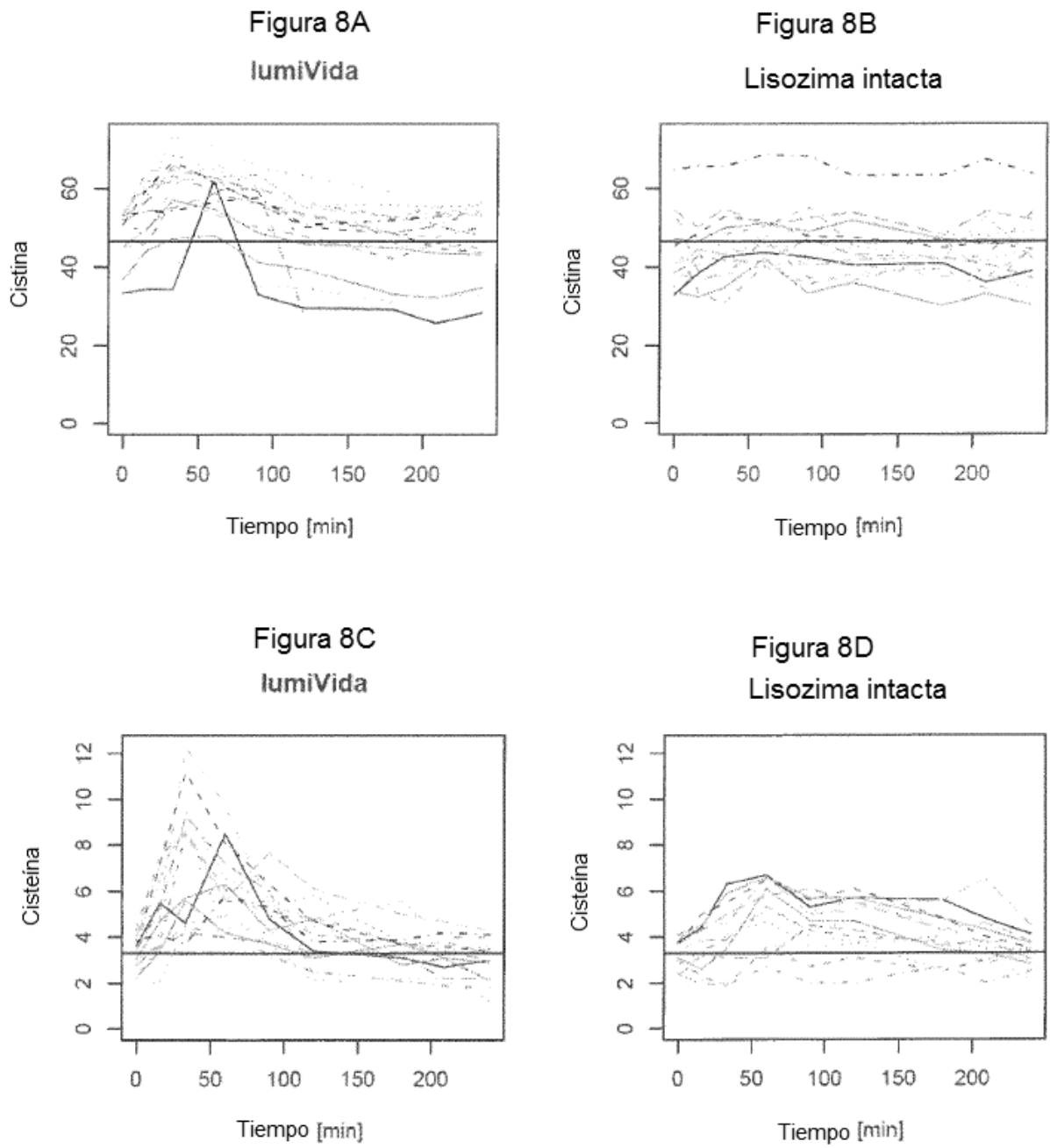


Figura 9

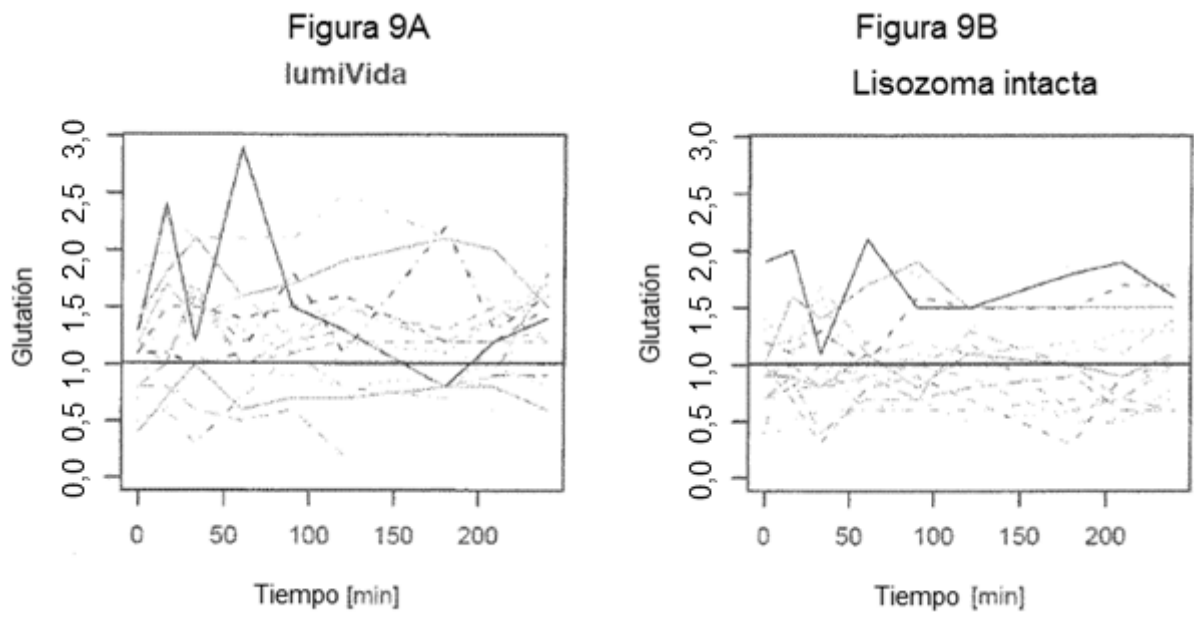


Figura 10

Figura 10A

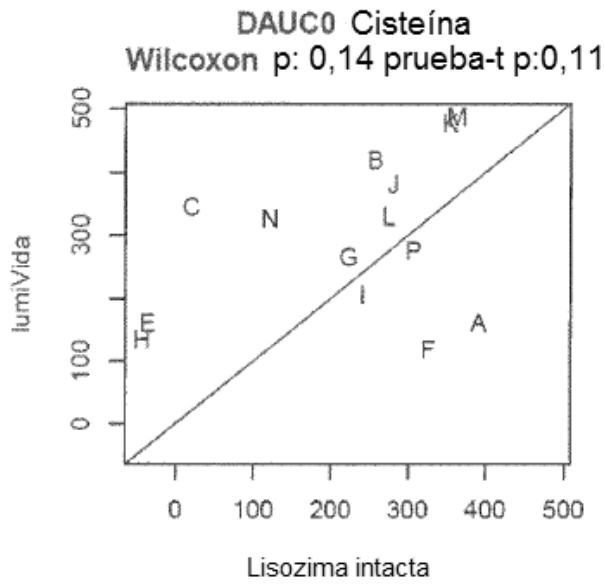


Figura 10B

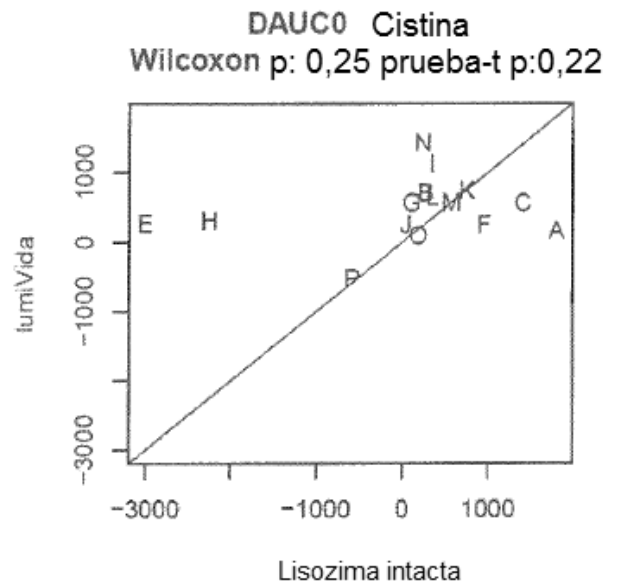


Figura 11

Figura 11A

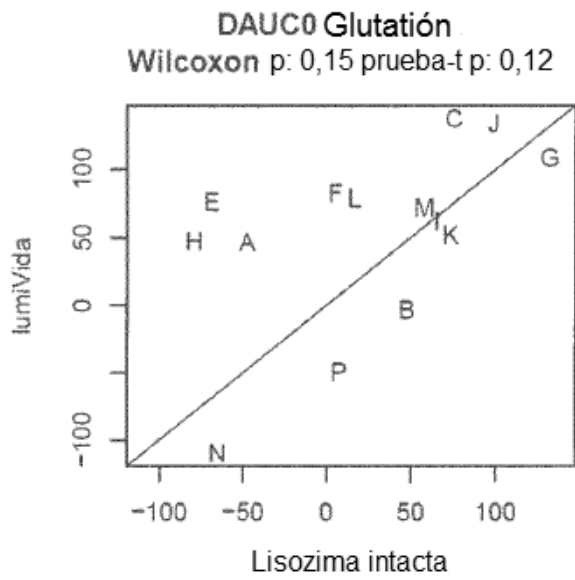


Figura 11B

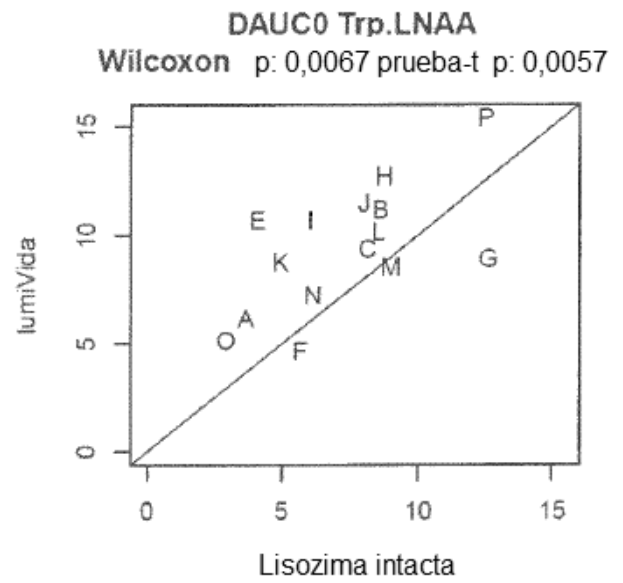


Figura 12

Figura 12A

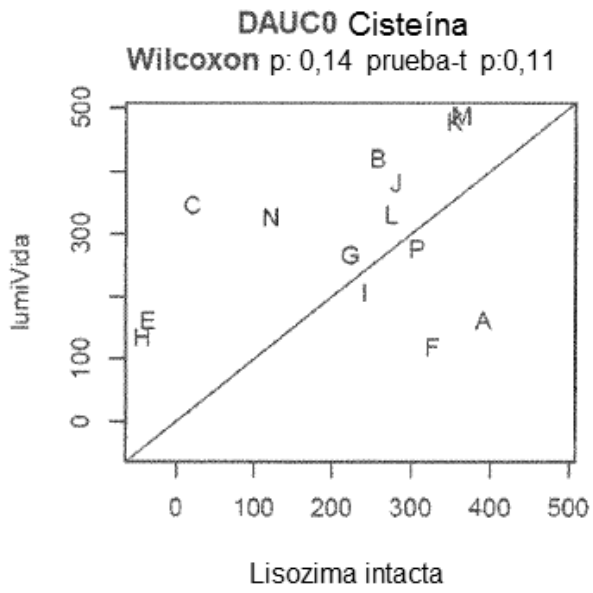


Figura 12B

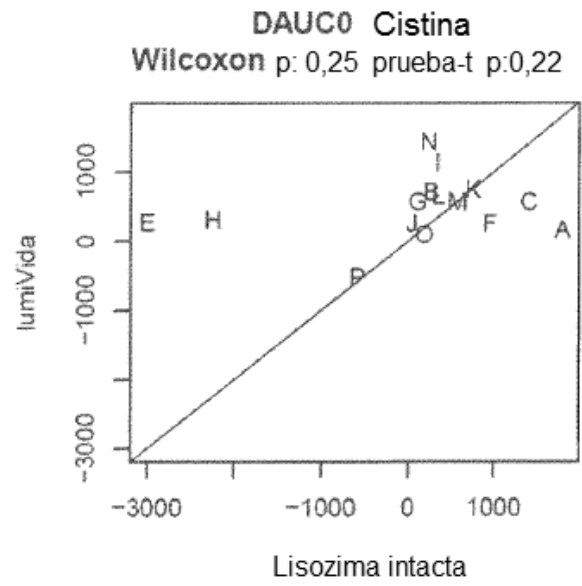


Figura 13

Figura 13A

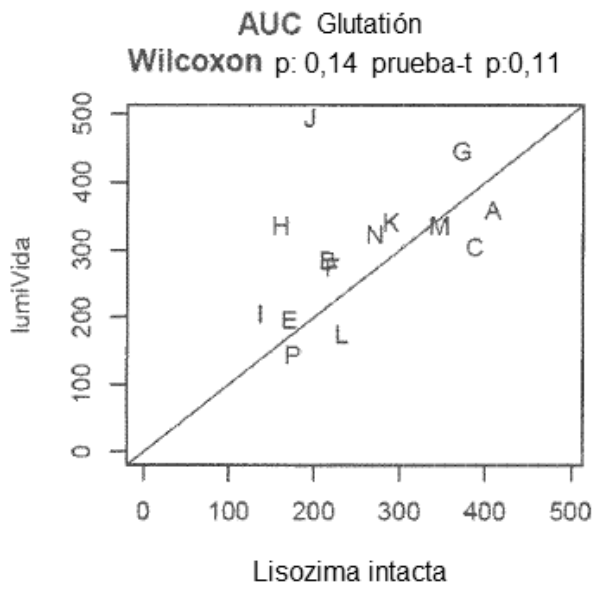


Figura 13B

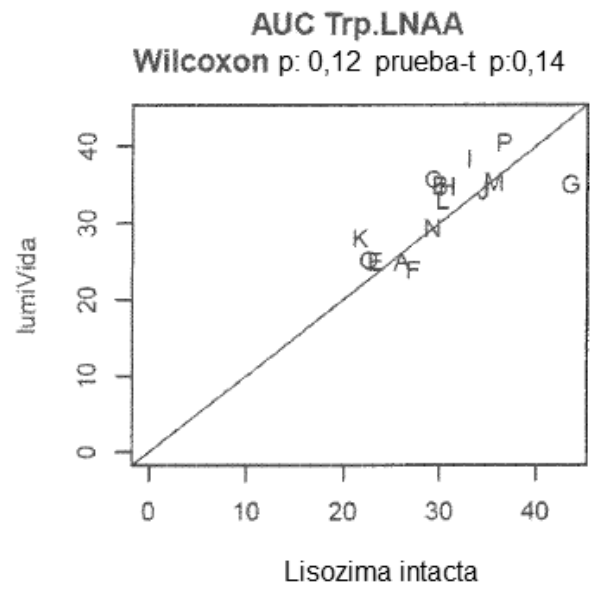


Figura 14

Figura 14A

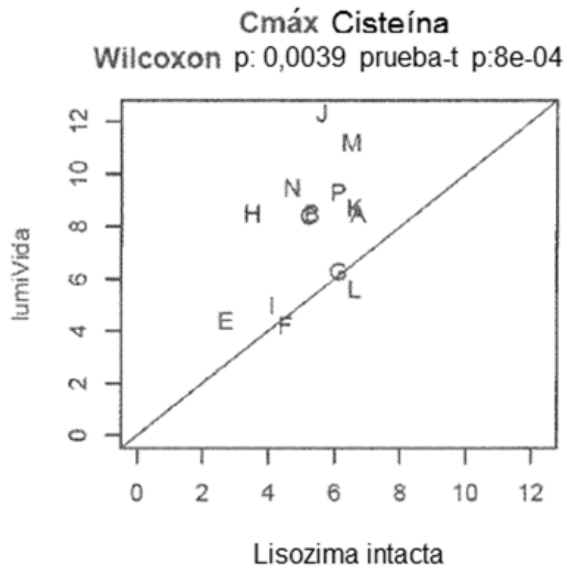


Figura 14B

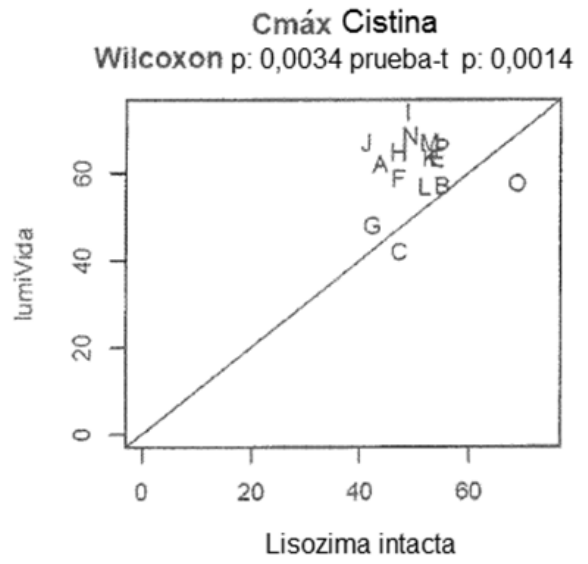


Figura 15

Figura 15A

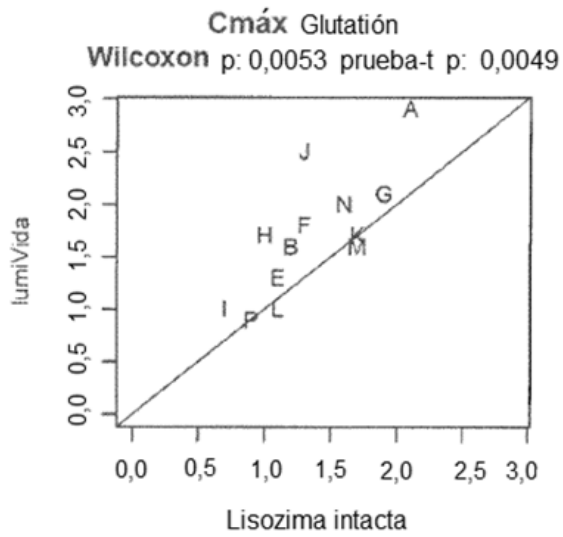


Figura 15B

