

**COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL
TRATAMIENTO DE HEMOGLOBINOPATÍAS Y TALASEMIAS**

SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La presente solicitud reivindica la prioridad del
número de serie de EE.UU. 62/687721 presentada el 20 de
junio de 2019 y del número de serie de EE.UU. 62/804879
presentada el 13 de febrero de 2019, cuyo contenido se
incorpora en el presente documento a modo de referencia en
10 su totalidad.

ANTECEDENTES

Las hemoglobinopatías, tales como la drepanocitosis,
son trastornos genéticos de eritrocitos altamente
prevalentes que provocan una carga para la salud
15 significativa en todo el mundo. Las hemoglobinopatías
abarcán una serie de anemias de origen genético en las que
hay una producción reducida y/o una hemólisis aumentada de
los eritrocitos. En particular, la drepanocitosis es un
grupo de trastornos genéticos que se manifiesta en la
20 producción de eritrocitos de forma de hoz y se
caracterizan por anemia hemolítica y eventos de
vasooclusión, además de períodos intensos de dolor,
insuficiencia de órganos y mortalidad temprana. La anemia
de células falciformes es la forma más común y grave de
25 drepanocitosis (SCD, del inglés *sickle cell disease*), que
afecta a aproximadamente 100,000 personas en los Estados
Unidos y a 4.4 millones en todo el mundo. Para muchos
pacientes la SCD se define por una insuficiencia crónica
de órganos puntuada por complicaciones agudas y una
30 mortalidad temprana. Las terapias actuales para la SCD se
limitan a un tratamiento de apoyo de las complicaciones, a

transfusiones de eritrocitos, hidroxurea y trasplante de células madre.

Dada la ausencia de terapias disponibles, aún existe la necesidad de agentes, por ejemplo, de composiciones dietéticas y agentes terapéuticos para el tratamiento de las hemoglobinopatías, tales como SCD, en un sujeto.

SUMARIO DE LA INVENCION

En el presente documento se proporciona una composición (por ejemplo, un Resto Activo) que incluye entidades de aminoácidos que es útil para mejorar la función, el recambio y la síntesis de los eritrocitos y/o de la hemoglobina; la función vascular; la inflamación; y/o el estrés oxidativo en un sujeto, por ejemplo, un sujeto con una hemoglobinopatía (por ejemplo, drepanocitosis) o una talasemia (por ejemplo, α -talasemia o β -talasemia). La composición se puede usar en un método de tratamiento (por ejemplo, reversión, reducción, mejora o prevención) de uno o más síntomas de una hemoglobinopatía o una talasemia en un sujeto que lo necesite (por ejemplo, un ser humano). El método puede incluir además controlar al sujeto en una mejora en uno o más síntomas de una hemoglobinopatía o una talasemia después de la administración de la composición.

En un aspecto, la invención presenta un método de mejora de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más (por ejemplo, todos) de la función, el recambio o la síntesis de los eritrocitos; la función, el recambio o la síntesis de la hemoglobina; o la función vascular, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una composición (por ejemplo, un Resto Activo) que comprende:

- a) una entidad de aminoácido de leucina,
- b) una entidad de aminoácido de arginina,
- c) entidad de aminoácido de glutamina; y
- d) una entidad de N-acetilcisteína (NAC);

5 la composición no comprende un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, proteína del suero de la leche), o si un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud está presente, el péptido está presente en menos del: 10 % en peso del peso total de la
10 composición (por ejemplo, en forma seca);

 mejorando de este modo una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más (por ejemplo, todas) de la función, el recambio o la síntesis de los eritrocitos; la función, el recambio o la síntesis de la hemoglobina; o la función vascular en el
15 sujeto.

 En otro aspecto, la invención presenta un método de mejora de la función de los eritrocitos que comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de la composición descrita en el presente documento.

20 En otro aspecto, la invención presenta un método de mejora del recambio de eritrocitos que comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de la composición descrita en el presente documento.

 En otro aspecto, la invención presente un método de
25 mejora de la síntesis de eritrocitos que comprende administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de la composición descrita en el presente documento.

 En otro aspecto, la invención presenta un método de mejora de la función de la hemoglobina que comprende
30 administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de la composición descrita en el presente documento.

En otro aspecto, la invención presenta un método de mejora del recambio de la hemoglobina que comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de la composición descrita en el presente documento.

5 En otro aspecto, la invención presenta un método de mejora de la síntesis de hemoglobina que comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de la composición descrita en el presente documento. En otro aspecto, la invención presenta un método de mejora
10 de la función vascular que comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de la composición descrita en el presente documento. En otro aspecto, la invención presenta un método de tratamiento de una hemoglobinopatía o una talasemia, que comprende
15 administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de una composición (por ejemplo, un Resto Activo) que comprende:

- a) una entidad de aminoácido de leucina,
- b) una entidad de aminoácido de arginina,
- 20 c) entidad de aminoácido de glutamina; y
- d) una entidad de N-acetilcisteína (NAC);

la composición no comprende un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, proteína del suero de la leche), o si un péptido de más de 20 restos
25 de aminoácidos de longitud está presente, el péptido está presente en menos del: 10 % en peso del peso total de la composición (por ejemplo, en forma seca);

tratando así la hemoglobinopatía o la talasemia en el sujeto.

30 En otro aspecto, la invención presenta un método de reducción del estrés oxidativo (por ejemplo, uno o ambos de estrés oxidativo en sangre y sistémico (por ejemplo, uno o

ambos de estrés oxidativo en sangre y sistémico) o inflamación, que comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de una composición (por ejemplo, un Resto Activo) de cualquiera de los aspectos o realizaciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el sujeto está en riesgo de, o ha sido diagnosticado con una hemoglobinopatía (por ejemplo, una β -hemoglobinopatía) o una talasemia. En ciertas realizaciones, la hemoglobinopatía es una drepanocitosis.

10 En otra realización, la α -talasemia es α -talasemia o β -talasemia.

En otro aspecto, la invención presenta una composición para su uso en un método de mejora de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más (por ejemplo, todas) de la función, el recambio o la síntesis de los eritrocitos; la función, el recambio o la síntesis de la hemoglobina; o la función vascular en un sujeto que lo necesite, en donde la composición comprende una cantidad eficaz de:

- a) una entidad de aminoácido de leucina,
- b) una entidad de aminoácido de arginina,
- c) entidad de aminoácido de glutamina; y
- d) una entidad de N-acetilcisteína (NAC),

en donde la composición no comprende un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, proteína del suero de la leche), o si un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud está presente, el péptido está presente en menos del: 10 % en peso del peso total de los componentes totales de la composición (por ejemplo, en forma seca).

En otro aspecto, la invención presenta un método de tratamiento de una hemoglobinopatía o una talasemia en un

sujeto que lo necesite, en donde la composición comprende una cantidad eficaz de:

- a) una entidad de aminoácido de leucina,
- b) una entidad de aminoácido de arginina,
- c) entidad de aminoácido de glutamina; y
- d) una entidad de N-acetilcisteína (NAC)

en donde la composición no comprende un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, proteína del suero de la leche), o si un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud está presente, el
5 péptido está presente en menos del: 10 % en peso del total de componentes de la composición (por ejemplo, en forma seca). En algunas realizaciones, la drepanocitosis se elige de anemia de células falciformes (HbSS), enfermedad de hemoglobina SC (HbSC), talasemia falciforme β^+ (HbS/ β^+),
10 talasemia falciforme β^0 (HbS/ β^0), enfermedad de hemoglobina SE, enfermedad de hemoglobina SD o enfermedad de hemoglobina S0.

En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado una, dos, tres, cuatro,
15 cinco, seis, siete, ocho o más (por ejemplo, todas) de: una reducción en la producción de especies reactivas de oxígeno; una reducción en un nivel o actividad de la arginasa plasmática; un aumento en la síntesis de glutatión; una reducción en la adhesión de eritrocitos al
20 endotelio y a otras células; un aumento en la resistencia de los eritrocitos a la falciformación; un aumento en el flujo de entrada de calcio en los eritrocitos; un aumento en el anabolismo; un aumento en la síntesis de óxido nítrico; o un aumento en la síntesis de hemoglobina.

25 En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado una mejora en una, dos, tres,

cuatro o más (por ejemplo, todas) de: anemia; hemólisis; vasooclusión; isquemia; o dolor.

En algunas realizaciones, la composición comprende además: (e) uno o ambos de una entidad de aminoácido de glicina o una entidad de carnitina.

En otro aspecto, la invención presenta una composición que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en:

- a) una entidad de aminoácido de leucina,
- b) una entidad de aminoácido de arginina,
- c) entidad de aminoácido de glutamina;
- d) una entidad de N-acetilcisteína (NAC); y
- e) uno o ambos de una entidad de aminoácido de glicina o una entidad de carnitina.

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de carnitina es al menos el 1 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de glicina es al menos el 3 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, la isoleucina está ausente de la composición, o si está presente, está presente en menos del: 10 % en peso; 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos, por ejemplo, del peso total de la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, la composición comprende además una, dos o más (por ejemplo, todas) de (f) una entidad de aminoácido de valina, (g) una entidad de

aminoácido de histidina, o (h) una entidad de aminoácido de lisina.

En algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más (por ejemplo, todas) de (a)-(h) se
5 seleccionan de la Tabla 1.

En algunas realizaciones, la composición no comprende un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, proteína del suero de la leche) o si un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud está
10 presente, el péptido está presente en menos del: 10 % en peso, 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos del peso total de los componentes totales de la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más (por ejemplo, todas) de (a)-(h) están en forma de aminoácido libre en la composición, por ejemplo, al menos: el 42 % en peso, el 75 % en peso, el 90 % en peso o más del peso total de la composición (por
15 ejemplo, en forma seca) es una, dos, tres, cuatro, cinco o más (por ejemplo, todas) de (a)-(f) en forma de aminoácido libre en la composición.

En algunas realizaciones, el % de peso total de (a)-(d), (a)-(e), (a)-(f) o (a)-(h) es mayor que el % de peso
25 total de los componentes de proteína de entidad no de aminoácidos (por ejemplo, proteína del suero de la leche) o componentes no de proteína (o ambos) en la composición (por ejemplo, en forma seca), por ejemplo, (a)-(d), (a)-(e), (a)-(f) o (a)-(h) es al menos: el 50 % en peso, el 75 % en
30 peso o el 90 % en peso del peso total de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, la composición comprende una combinación de 18 o menos, 15 o menos, o 12 o menos entidades de aminoácidos, por ejemplo, la combinación que comprende al menos: el 42 % en peso, el 75 % en peso o el 90 % en peso del peso total de los componentes de la entidad de aminoácidos en la composición o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el triptófano está ausente de la composición, o si está presente, está presente en menos del: 10 % en peso; 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos, por ejemplo, del peso total de la composición (por ejemplo, en forma seca). En algunas realizaciones, el triptófano, si está presente, está presente en forma libre. En algunas realizaciones, el triptófano, si está presente, está presente en forma de sal.

En algunas realizaciones, el triptófano, si está presente, puede estar presente en un oligopéptido, un polipéptido o proteína, siempre que la proteína no sea proteína del suero de la leche, caseína, lactalbúmina o cualquier otra proteína usada como un suplemento nutricional, alimento médico o producto similar, bien si está presente como proteína intacta o hidrolizado proteico.

En algunas realizaciones, la proporción en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, la entidad de aminoácido de glutamina y la entidad de NAC es 3.6 +/-20%: 4.5 +/-20%: 11 +/-20%: 1.2 +/-20%. En algunas realizaciones, la proporción en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, la entidad de aminoácido de glutamina, la entidad de NAC, la entidad de carnitina y la

entidad de aminoácido de glicina es 3.6 +/-20%: 4.5 +/-20%:
11 +/-20%: 1.2 +/-20%: 1 +/-20%: 2.7 +/-20%.

En algunas realizaciones, la composición (por ejemplo,
el Resto Activo) comprende, consiste esencialmente en, o
5 consiste en:

a) la entidad de aminoácido de leucina se elige de:

i) L-leucina o una sal de la misma,

ii) un dipéptido o sal del mismo, o un tripéptido
o una sal del mismo, que comprende L-leucina o iii)

10 β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) o una sal de los mismos;

b) la entidad de aminoácido de arginina se elige de:

i) L-arginina o una sal de la misma,

ii) un dipéptido o una sal del mismo, o un
tripéptido o una sal del mismo, que comprende L-arginina,

15

iii) creatina o una sal de la misma, o

v) un dipéptido o una sal del mismo, o un
tripéptido o una sal del mismo, que comprende creatina;

c) la entidad de aminoácido de glutamina es L-

20 glutamina o una sal del mismo o un dipéptido o una sal del
mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende
L-glutamina;

d) la entidad de NAC o una sal de la misma o un
dipéptido o una sal del mismo, que comprende NAC; y

25

e) uno o ambos de:

i) la entidad de aminoácido de glicina es L-
glicina o una sal del mismo o un dipéptido o una sal
del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que
comprende L-glicina; o

30

ii) la entidad de carnitina es L-carnitina o una
sal del mismo, o un dipéptido o una sal del
mismo, que comprende L-carnitina.

En algunas realizaciones, la composición (por ejemplo, un Resto Activo) comprende además una, dos o más (por ejemplo, todas) de:

5 (f) la entidad de aminoácido de valina es L-valina o una sal de la misma o un dipéptido o una sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende L-valina;

10 (g) la entidad de aminoácido de histidina es L-histidina o una sal de la misma o un dipéptido o una sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende L-histidina; o

15 (h) la entidad de aminoácido de lisina es L-lisina o una sal de la misma o un dipéptido o una sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende L-lisina.

En algunas realizaciones, la composición (por ejemplo, un Resto Activo) comprende, consiste esencialmente en, o consiste en:

20 a) la entidad de aminoácido de leucina es L-leucina o una sal del mismo;

b) la entidad de aminoácido de arginina es L-arginina o una sal del mismo;

c) la entidad de aminoácido de glutamina es L-glutamina o una sal del mismo;

25 d) la entidad de NAC es NAC o una sal de la misma; y

e) uno o ambos de la entidad del aminoácido de glicina es L-glicina o una sal del mismo o la entidad de carnitina es L-carnitina o una sal de la misma.

30 En algunas realizaciones, la composición (por ejemplo, un Resto Activo) comprende, consiste esencialmente en, o consiste en:

a) la entidad de aminoácido de leucina es L-leucina o una sal del mismo;

b) la entidad de aminoácido de arginina es L-arginina o una sal del mismo;

5 c) la entidad de aminoácido de glutamina es L-glutamina o una sal del mismo;

d) la entidad de NAC es NAC o una sal de la misma;

e) uno o ambos de la entidad de aminoácido de glicina es L-glicina o una sal de la misma o la entidad de
10 carnitina es L-carnitina o una sal de la misma;

f) la entidad de aminoácido de valina es L-valina o una sal de la misma;

g) la entidad de aminoácido de histidina es L-histidina o una sal de la misma; y

15 h) la entidad de aminoácido de lisina es L-lisina o una sal de la misma.

En otro aspecto, la invención presenta una composición que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en:

20 a) una entidad de aminoácido de leucina,
b) una entidad de aminoácido de arginina,
c) una entidad de aminoácido de glutamina,
d) una entidad de N-acetilcisteína,

e) una entidad de aminoácido de citrulina,
25 f) una entidad de carnitina,

g) una entidad de aminoácido de serina,
h) una entidad de aminoácido de valina,
i) una entidad de aminoácido de histidina, y
j) una entidad de aminoácido de lisina.

30 En algunas realizaciones, la isoleucina está ausente de la composición, o si está presente, está presente en menos del: 10 % en peso, 9 % en peso, 8 % en peso, 7 % en

peso, 6 % en peso, 5 % en peso, 4 % en peso, 3 % en peso, 2 % en peso, 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos, por ejemplo, del peso total de la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más (por ejemplo, todas) de (a)-(j) se seleccionan de la Tabla 1.

En algunas realizaciones, la composición no comprende un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, proteína del suero de la leche) o si un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud está presente, el péptido está presente en menos del: 10 % en peso, 9 % en peso, 8 % en peso, 7 % en peso, 6 % en peso, 5 % en peso, 4 % en peso, 3 % en peso, 2 % en peso, 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos del peso total de los componentes totales de la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más (por ejemplo, todas) de (a)-(j) están en forma de aminoácido libre en la composición, por ejemplo, al menos el: 42 % en peso, 45 % en peso, 50 % en peso, 55 % en peso, 60 % en peso, 65 % en peso, 70 % en peso, 75 % en peso, 80 % en peso, 85 % en peso, 90 % en peso, 95 % en peso, 97 % en peso, 98 % en peso o más del peso total de la composición (por ejemplo, en forma seca) es una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más (por ejemplo, todas) de (a)-(j) en forma de aminoácido libre en la composición.

En algunas realizaciones, el % de peso total de (a)-(j) es más del % de peso total de los componentes de la

proteína de entidad no de aminoácido (por ejemplo, proteína del suero de la leche) o componentes no de proteína (o ambos) en la composición (por ejemplo, en forma seca), por ejemplo, (a)-(j) es al menos el: 50 % en peso, 55 % en peso, 60 % en peso, 65 % en peso, 70 % en peso, 75 % en peso, 80 % en peso, 85 % en peso, 90 % en peso, 95 % en peso, 97 % en peso, 98 % en peso o más, del peso total de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, la composición comprende una combinación de 18 o menos, 17 o menos, 16 o menos, 15 o menos, 14 o menos, 13 o menos, 12 o menos, u 11 o menos entidades de aminoácido.

En algunas realizaciones, la composición (por ejemplo, el Resto Activo) comprende, consiste esencialmente en, o consiste en:

- a) la entidad de aminoácido de leucina se elige de:
 - i) L-leucina o una sal de la misma,
 - ii) un dipéptido o sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende L-leucina o β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB) o una sal de los mismos;
 - iii)
- b) la entidad de aminoácido de arginina se elige de:
 - i) L-arginina o una sal de la misma,
 - ii) un dipéptido o una sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende L-arginina,
 - iii) creatina o una sal de la misma, o
 - v) un dipéptido o una sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende creatina;
- c) la entidad de aminoácido de glutamina es L-glutamina o una sal del mismo o un dipéptido o una sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende L-glutamina;

d) la entidad de NAC es NAC o una sal de la misma o un dipéptido o una sal del mismo que comprende NAC;

e) la entidad de aminoácido citrulina es L-citrulina o una sal de la misma, o un dipéptido o una sal del mismo, o
5 un tripéptido o una sal del mismo, que comprende L-citrulina;

f) la entidad de carnitina es L-carnitina o una sal de la misma, o un dipéptido o una sal del mismo, que comprende L-carnitina;

10 g) la entidad de aminoácido de serina es L-serina o una sal de la misma, o un dipéptido o una sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo que comprende L-serina;

h) la entidad de aminoácido de valina es L-valina o una sal de la misma, o un dipéptido o una sal del mismo, o
15 un tripéptido o una sal del mismo que comprende L-valina;

i) la entidad de aminoácido de histidina es L-histidina o una sal de la misma, o un dipéptido o una sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo que comprende L-histidina; y

20 j) la entidad de aminoácido de lisina es L-lisina o una sal de la misma, o un dipéptido o una sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende L-lisina.

En algunas realizaciones, la composición (por ejemplo, un Resto Activo) comprende, consiste esencialmente en, o
25 consiste en:

- a) L-leucina o una sal de la misma,
- b) L-arginina o una sal de la misma,
- c) L-glutamina o una sal de la misma,
- d) NAC o una sal de la misma,
- 30 e) L-citrulina o una sal de la misma,
- f) L-carnitina o una sal de la misma,
- g) L-serina o una sal de la misma,

- h) L-valina o una sal de la misma,
- i) L-histidina o una sal de la misma, y
- j) L-lisina o una sal de la misma.

En otro aspecto, la invención presenta un método de mejora de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (por ejemplo todas) de la función, el recambio o la síntesis de eritrocitos; la función, el recambio o la síntesis de hemoglobina; la función vascular; el estrés oxidativo (por ejemplo, una o ambas de estrés oxidativo en sangre o sistémico); o inflamación, que comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de la composición (por ejemplo, un Resto Activo) de cualquiera de los aspectos o realizaciones descritas en el presente documento, mejorando así una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (por ejemplo, todas) de la función, el recambio o la síntesis de eritrocitos; la función, el recambio o la síntesis de hemoglobina; la función vascular, el estrés oxidativo (por ejemplo, uno o ambos de estrés oxidativo en sangre o sistémico); o inflamación en el sujeto.

En otro aspecto, la invención presenta un método de tratamiento de una hemoglobinopatía o una talasemia, que comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de una composición (por ejemplo, un Resto Activo) de cualquiera de los aspectos o realizaciones descritas en el presente documento, tratando así la hemoglobinopatía o la talasemia en el sujeto.

En otro aspecto, la invención presenta una composición para su uso en un método de mejora de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (por ejemplo, todas) de la función, el recambio o la síntesis de eritrocitos; la función, el recambio o la síntesis de hemoglobina; el

estrés oxidativo (por ejemplo, uno o ambos de estrés oxidativo en sangre o sistémico); o inflamación, que comprende una cantidad eficaz de una composición (por ejemplo, un Resto Activo) de cualquiera de los aspectos o realizaciones descritas en el presente documento.

En otro aspecto, la invención presenta una composición para su uso en un método de tratamiento de una hemoglobinopatía o una talasemia, que comprende una cantidad eficaz de una composición (por ejemplo, un Resto Activo) de cualquiera de los aspectos o realizaciones descritas en el presente documento.

En algunas realizaciones, el sujeto está en riesgo de, o ha sido diagnosticado con una hemoglobinopatía (por ejemplo, una β -hemoglobinopatía) o una talasemia. En ciertas realizaciones, la hemoglobinopatía es una drepanocitosis. En otra realización, la α -talasemia es α -talasemia o β -talasemia.

En algunas realizaciones, la drepanocitosis se elige de anemia de células falciformes (HbSS), enfermedad de hemoglobina SC (HbSC), talasemia falciforme β^+ (HbS/ β^+), talasemia falciforme β^0 (HbS/ β^0), enfermedad de hemoglobina SE, enfermedad de hemoglobina SD o enfermedad de hemoglobina SO.

En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (por ejemplo, todas) de: una reducción en la producción de especies reactivas de oxígeno, una reducción en un nivel o actividad de arginasa plasmática, un aumento en la síntesis de glutatión; una reducción en la adhesión de eritrocitos al endotelio y a otras células, un aumento en la resistencia de los eritrocitos a la falciformación, un aumento en el

anabolismo, un aumento en la síntesis de óxido nítrico o un aumento en la síntesis de hemoglobina.

En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado una mejora en una, dos, tres, 5 cuatro o más (por ejemplo, todas) de: anemia, hemólisis, vasooclusión, isquemia o dolor.

En algunas realizaciones, la composición (un Resto Activo) se formula con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En algunas realizaciones, la composición (por ejemplo, el Resto Activo) se formula como una composición dietética. En algunas realizaciones, la composición dietética se elige de un alimento médico, un alimento funcional o un suplemento.

15 En algunas realizaciones, la composición es una preparación mezclada en seco, por ejemplo, una preparación mezclada en seco de calidad farmacéutica (PGDBP, siglas del inglés *pharmaceutical grade dry blended preparation*).

En otro aspecto, la invención presenta un método de fabricación de una preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP, que comprende al menos 4 entidades de aminoácidos de grado farmacéutico, comprendiendo dicho método:

formar una combinación de al menos 4 entidades de aminoácidos de grado farmacéutico y mezclar la combinación durante un tiempo suficiente para lograr una preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP,

En donde la preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP, comprende: a) una entidad de aminoácido de leucina, b) una entidad de aminoácido de arginina, c) una entidad de aminoácido de glutamina; y d) una entidad de N-acetilcisteína (NAC).

En algunas realizaciones, la preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP, comprende además una, dos, tres, cuatro, cinco o más (por ejemplo, todas) de: e) una entidad de aminoácido de citrulina, f) una entidad de carnitina, g) una entidad de aminoácido de serina, h) una entidad de aminoácido de valina, i) una entidad de aminoácido de histidina, y i) una entidad de aminoácido de lisina.

En algunas realizaciones, una, dos, o tres de: (i) la mezcla tiene lugar a una temperatura menor de 40°C; (ii) la mezcla comprende mezclar o combinar en un mezclador o combinador a una velocidad de menos de 1000 rpm o (iii) el
5 método comprende además realizar una, dos o tres de mezcla directa, compactación con rodillo o granulación húmeda sobre la preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP.

En otro aspecto, la invención presenta un método de fabricación de una preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP, que comprende al menos 4 entidades de aminoácidos de grado farmacéutico, comprendiendo dicho método:

formar una combinación de al menos 4 entidades de aminoácidos de grado farmacéutico y mezclar la combinación durante un tiempo suficiente para lograr una preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP,

en donde la preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP, comprende:

- a) una entidad de aminoácido de arginina,
- b) una entidad de aminoácido de citrulina, y
- c) una entidad de N-acetilcisteína.

En algunas realizaciones, la preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP, comprende además una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de: a) una entidad de aminoácido de leucina, b) una entidad de aminoácido de

glutamina, c) una entidad de carnitina, d) una entidad de aminoácido de serina, e) una entidad de aminoácido de valina, f) una entidad de aminoácido de histidina, y g) una entidad de aminoácido de lisina.

En otro aspecto, la invención presenta una composición que comprende:

- a) una entidad de aminoácido de arginina,
 - b) una entidad de aminoácido de citrulina; y
 - c) una entidad de N-acetilcisteína (NAC),
- en donde una, dos o tres de:

(i) la composición no comprende un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, proteína del suero de la leche), o si un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud está presente, el péptido está presente en menos del: 10 % en peso del peso total de la composición (por ejemplo, en forma seca);

(ii) al menos el 50 % en peso del peso total de la composición (por ejemplo, en forma seca) es una o más entidades de aminoácido en forma libre; o

(iii) el % en peso de la entidad de aminoácido de citrulina es mayor que el % en peso de la entidad de NAC.

En algunas realizaciones, la composición tiene una, dos o tres de las siguientes características:

(i) el % en peso de la entidad de aminoácido de citrulina en la composición (por ejemplo, en forma seca) es al menos el 50 % mayor que el % en peso de la entidad de NAC, por ejemplo, el % en peso de la entidad de aminoácido de citrulina es al menos el 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % mayor que el % en peso de la entidad de NAC;

(ii) el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de citrulina, y la entidad de NAC es al menos el: 20 % en peso, 25 % en peso,

30 % en peso o 35 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 80 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca); o

(iii) el % en peso de la entidad de aminoácido de citrulina es al menos el: 5 % en peso, 10 % en peso, 11 % en peso, 12 % en peso, 13 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 60 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, la composición comprende además una o ambas de: (d) una entidad de aminoácido de carnitina; o (e) una entidad de aminoácido de glutamina.

En algunas realizaciones, la composición comprende:

- a) la entidad de aminoácido de arginina se elige de:
 - i) L-arginina o una sal de la misma,
 - ii) un dipéptido o una sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende L-arginina,
 - iii) creatina o una sal de la misma, o
 - v) un dipéptido o una sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende creatina;
- b) la entidad de aminoácido de citrulina es L-citrulina o una sal de la misma o un dipéptido o una sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende L-citrulina; y
- c) la entidad de NAC es NAC o una sal del mismo o un dipéptido o una sal del mismo que comprende NAC.

En otro aspecto, la invención presenta una composición que comprende:

- a) una entidad de aminoácido de arginina,
 - B) una entidad de aminoácido de citrulina;
 - c) una entidad de N-acetilcisteína (NAC);
 - (d) una entidad de aminoácido de carnitina; y
 - (e) una entidad de aminoácido de glutamina,
- en donde una, dos o tres de:

(i) la composición no comprende un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, proteína del suero de la leche), o si un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud está presente, el péptido está presente en menos del: 10 % en peso del peso total de la composición (por ejemplo, en forma seca);

(ii) al menos el 50 % en peso del peso total de la composición (por ejemplo, en forma seca) es una o más entidades de aminoácido en forma libre; o

(iii) el % en peso de la entidad de aminoácido de citrulina es mayor que el % en peso de la entidad de NAC.

En algunas realizaciones, la composición tiene una, dos, tres o cuatro de las siguientes características:

(i) el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de citrulina, la entidad de NAC, la entidad de aminoácido de carnitina y la entidad de aminoácido de glutamina es al menos el: 40 % en peso, 45 % en peso, 50 % en peso, 55 % en peso o 60 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 90 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca);

(ii) el % en peso de la entidad de aminoácido de citrulina en la composición (por ejemplo, en forma seca) es

mayor que el % en peso de la entidad de aminoácido de carnitina, por ejemplo, el % en peso de la identidad de aminoácido de citrulina en la composición (por ejemplo, en forma seca) es al menos el 50 % mayor que el % en peso de la entidad de aminoácido de carnitina, por ejemplo, el % en peso de la entidad de aminoácido de citrulina es al menos el 60 %, 65 %, 70 %, 75 % u 80 % mayor que el % en peso de la entidad de aminoácido de carnitina;

(iii) el % en peso de la entidad de aminoácido de glutamina en la composición (por ejemplo, en forma seca) es mayor que el % en peso de la entidad de aminoácido de citrulina, por ejemplo, el % en peso de la entidad de aminoácido de glutamina en la composición (por ejemplo, en forma seca) es al menos el 40 % mayor que el % en peso de la entidad de aminoácido de citrulina, por ejemplo, el % en peso de la entidad de aminoácido de glutamina es al menos el 60 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % o 65 % mayor que el % en peso de la entidad de aminoácido de citrulina; o

(iv) el % en peso de la entidad de aminoácido de citrulina y la entidad de aminoácido de arginina en combinación en la composición (por ejemplo, en forma seca) es mayor que el % en peso de la entidad de aminoácido de glutamina, por ejemplo, el % en peso de la entidad de aminoácido de citrulina en la composición (por ejemplo, en forma seca) es al menos el 20 % mayor que el % en peso de la entidad de aminoácido de carnitina, por ejemplo, el % en peso de la entidad de aminoácido de citrulina es al menos el 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % mayor que el % en peso de la entidad de aminoácido de carnitina.

En algunas realizaciones, la composición comprende además una, dos o tres de: (f) una entidad de aminoácido de leucina, (g) una entidad de aminoácido de serina, (h) una

entidad de aminoácido de valina, (i) una entidad de aminoácido de histidina o (j) una entidad de aminoácido de lisina.

En algunas realizaciones, la composición comprende:

- a) la entidad de aminoácido de arginina se elige de:
 - i) L-arginina o una sal de la misma,
 - ii) un dipéptido o una sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende L-arginina,
 - iii) creatina o una sal de la misma, o
 - v) un dipéptido o una sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende creatina;
- b) la entidad de aminoácido de citrulina es L-citrulina o una sal de la misma o un dipéptido o una sal del mismo, o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende L-citrulina; y
- c) la entidad de NAC es NAC o una sal de la misma o un dipéptido o sal del mismo que comprende NAC;
- d) la entidad de carnitina es L-carnitina o una sal de la misma, o un dipéptido o una sal del mismo, que comprende L-carnitina; y
- e) la entidad de aminoácido de glutamina es L-glutamina o una sal de la misma o un dipéptido o una sal del mismo o un tripéptido o una sal del mismo, que comprende L-glutamina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra un perfil de deformabilidad de GR tras la oxidación ex vivo de la sangre completa (donante 1) con y sin hidroperóxido de terc-butilo y pretratamiento con
5 vehículo o aminoácidos.

La FIG. 2A muestra alineamientos de espectrógrafos NIR tomados en momentos de mezclado en aumento (0, 4, 8, 12, 16 y 20 minutos) de una PGDBP.

La FIG. 2B es un gráfico que muestra la cantidad
5 promedio y el error estándar de los aminoácidos en 4 muestras aleatorias del tiempo de mezclado de 20 minutos de una PGDBP (la PGDBP de la FIG. 1A).

La FIG. 3 es un esquema que muestra el diseño de un estudio clínico que presenta la administración de una
10 composición de aminoácidos a sujetos que tienen drepanocitosis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La disfunción física y metabólica de los glóbulos
15 rojos (GR) provoca complicaciones agudas y crónicas en casi todos los sistemas de órganos, tal como una hemoglobinopatía (por ejemplo, drepanocitosis) o una talasemia (por ejemplo, α -talasemia o β -talasemia). La disfunción y la lisis de los GR provocan innumerables
20 secuelas clínicas como vasooclusión, insuficiencia orgánica e infecciones. La disfunción de los GR se caracteriza por la falciformación de las células, estrés oxidativo, deshidratación y adhesión al endotelio, que puede complicar el paso de los GR a través de los microvasos. Las
25 complicaciones crónicas pueden provenir de una vida de anemia y acumulación de daño orgánico en la edad adulta, y pueden estar marcadas por eventos agudos como vasooclusión e insuficiencia orgánica repentina.

La drepanocitosis (SCD) describe un grupo de
30 trastornos sanguíneos severos que afectan a unos 85,000 adultos y 15,000 niños en los Estados Unidos, y a 4.4 millones de personas en todo el mundo. Los glóbulos rojos

falciformes, que son el sello distintivo de la SCD revelan solo una pequeña parte de la fisiopatología compleja y multifactorial que proviene de alteraciones en la función normal de la sangre y del sistema vascular. El tratamiento actual está limitado tanto en el alcance como en la magnitud del efecto, dejando una necesidad insatisfecha de agentes que ayuden a mitigar las complicaciones multifacéticas que surgen de la disfunción de la sangre y del sistema vascular.

Las composiciones de la invención están diseñadas para dirigirse a múltiples vías (producción e integridad de la sangre, función vascular, y desequilibrios de aminoácidos en plasma y GR) para mantener la función y la salud de la sangre.

Las entidades de aminoácidos y las cantidades relativas de las entidades de aminoácidos en las composiciones desveladas en el presente documento se han optimizado, por ejemplo, para [1] reducir la adhesión vascular, [2] mitigar la presentación de inflamación vascular, [3] defenderse frente a las agresiones a la deformabilidad y función de los glóbulos rojos (GR) y reducir las complicaciones asociadas con la SCD (por ejemplo, hemólisis, adhesión vascular, inflamación vascular, función vascular reducida, insuficiencia orgánica aguda y crónica) en un sujeto que requiere la coordinación de muchos procesos biológicos, celulares y moleculares. Sin quedar ligados a ninguna teoría, se entiende que una composición de la invención puede reprogramar la biología multifactorial del trastorno de [1] rigidez y fragilidad de los GR, [2] hemólisis, [3] adhesión vascular, [4] inflamación vascular y [5] disfunción vascular.

La composición descrita en el presente documento proporciona un enfoque multimodal y combinatorio para mejorar la disfunción de los glóbulos rojos, la hemólisis (por ejemplo, incluyendo anemia, hipoxia crónica, estrés oxidativo, agotamiento del óxido nítrico y/o disfunción vascular), vasooclusión (por ejemplo, incluyendo lesiones isquémicas, inflamación, coagulación y/o daño agudo a órganos), hematopoyesis alterada y/o fisiopatología de drepanocitosis. En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado mejora en el tono vascular, dilatación vascular y/o vasooclusión (por ejemplo, mejor disponibilidad de NO, función endotelial dependiente de NO y/o presión arterial). En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado una mejora de la deformabilidad de los GR, hemólisis reducida y/o inflamación vascular reducida (por ejemplo, tal como se determina mediante los niveles de glutatión (por ejemplo, glutatión en GR o en plasma), marcadores de estrés oxidativo, marcadores hemolíticos, citocinas y/o marcadores de adhesión). En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado un aumento en la síntesis de proteínas y/o un aumento en los sustratos proteogénicos para la hemoglobina para apoyar la síntesis de hemo. En algunas realizaciones, la administración de la composición da como resultado una mejora de la hematopoyesis y/o una mejora de la población de los glóbulos rojos (por ejemplo, mejora de los reticulocitos, hemoglobina, hemoglobina fetal, y/o células falciformes densas o irreversibles). La composición descrita en el presente documento se optimiza para dirigir una, dos o tres de: (i) restauración de arginina plasmática y óxido nítrico para mejorar la lesión vascular; (ii)

defensa antioxidante mejorada en los glóbulos rojos, plasma y todo el sistema; o (iii) apoyo anabólico y energético para una elevada demanda hematopoyética en un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene una hemoglobinopatía (por ejemplo, drepanocitosis) o una talasemia (por ejemplo, α -talasemia o β -talasemia).

En algunas realizaciones, la composición (por ejemplo, el Resto Activo) es capaz de mejorar una, dos, tres, cuatro o más (por ejemplo, todas) de función vascular mediada por NO, síntesis de proteínas, energía celular, inflamación o síntesis de hemo. En algunas realizaciones, la composición es capaz de restaurar la función endotelial dependiente de NO, reducir el riesgo de eventos de vasooclusión, mejorar la salud vascular, reducir la hemólisis y/o reducir el estrés oxidativo. En algunas realizaciones, la composición es capaz de proporcionar una elevada biodisponibilidad de arginina para la síntesis de NO. En algunas realizaciones, la composición es capaz de aumentar el recambio de los GR, la síntesis de proteínas (por ejemplo, la síntesis de hemoglobina, por ejemplo, en progenitores hematopoyéticos y/o reticulocitos) y/o la síntesis de hemo. En algunas realizaciones, la composición es capaz de proporcionar apoyo energético para las células altamente proliferativas (por ejemplo, precursores hematopoyéticos y/o células inmunitarias).

En el presente documento se describe, en parte, una composición (un Resto Activo) que comprende entidades de aminoácidos y métodos de mejora de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (por ejemplo, todas) de la función, el recambio o la síntesis de los eritrocitos; la función, el recambio o la síntesis de hemoglobina; la función vascular; el estrés oxidativo (por ejemplo, una o

ambas de estrés oxidativo en sangre y sistémico); o la inflamación mediante la administración de una cantidad eficaz de la composición. La composición se puede administrar para tratar una hemoglobinopatía (por ejemplo, 5 drepanocitosis) o una talasemia (por ejemplo, α -talasemia o β -talasemia) en un sujeto que lo necesite. Las entidades de aminoácidos y las cantidades relativas de las entidades de aminoácidos en la composición se han seleccionado cuidadosamente, por ejemplo, para mejorar la función, el 10 recambio o la síntesis de los eritrocitos y/o de la hemoglobina en un sujeto (por ejemplo, un sujeto que tiene una hemoglobinopatía (por ejemplo, SCD) o una talasemia) que requiere la coordinación de muchos procesos biológicos, celulares y moleculares. La composición permite efectos 15 beneficiosos de múltiples vías sobre la patología a nivel de sistemas de una hemoglobinopatía o una talasemia. En particular, la composición se ha diseñado específicamente para tratar el estrés oxidativo, enfermedad vascular, inflamación y el aumento en el recambio, la síntesis y la 20 disfunción de los eritrocitos y de la hemoglobina.

Las enfermedades complejas, tales como la hemoglobinopatía (por ejemplo drepanocitosis) o talasemia (por ejemplo, α -talasemia o β -talasemia), afectan a 25 múltiples vías biológicas. La pérdida de salud puede ser el resultado directo de las vías metabólicas y de las funciones que no se están manteniendo o a las que no se les da soporte. En consecuencia, el reestablecimiento de la homeostasis y el mantenimiento de la salud requiere enfoques multifactoriales. Las composiciones descritas en 30 el presente documento son candidatas intervencionistas para abordar el impacto en todo el sistema del metabolismo desregulado para apoyar y mantener la homeostasis, que

ayuda a mantener las estructuras y funciones normales del cuerpo.

La composición descrita en el presente documento se ha optimizado para dirigir de manera directa y simultánea
5 múltiples vías metabólicas implicadas tanto en enfermedades complejas (por ejemplo, un sujeto que tiene una hemoglobinopatía (por ejemplo, SCD) o una talasemia) como en la salud global. Las distintas proporciones de cada una de las entidades de aminoácido en la composición están
10 diseñadas para dirigir y maximizar el papel fundamental de la composición en la regulación de múltiples funciones metabólicas (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (por ejemplo, todas) de la función, el recambio o la síntesis de eritrocitos; la función, el
15 recambio o la síntesis de hemoglobina; la función vascular; el estrés oxidativo (por ejemplo, uno o ambos de estrés oxidativo en sangre y sistémico). En particular, la composición descrita en el presente documento puede apoyar y mantener la salud de la sangre, lo que es crucial para
20 una multitud de funciones metabólicas a través del cuerpo.

La composición descrita en el presente documento se ha diseñado para dirigir múltiples vías biológicas con el objetivo de apoyar estructuras y funciones normales de la sangre. En particular, la administración de la composición
25 descrita en el presente documento puede mejorar y/o tratar una, dos, tres o más de la producción reducida de sangre, la integridad reducida de sangre, el desequilibrio de aminoácidos en plasma y/o GR, la salud vascular reducida, o la inflamación, por ejemplo, en un sujeto con una
30 hemoglobinopatía (por ejemplo, drepanocitosis) o una talasemia (por ejemplo, α -talasemia o β -talasemia). En algunas realizaciones, la administración de la composición

a un sujeto mejora o mantiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más de las siguientes: (a) proliferación y/o maduración de células sanguíneas durante la demanda hematopoyética; (b) formación y/o función de los GR frente a la deshidratación; (c) rigidez; (d) transporte de oxígeno; (e) equilibrio de aminoácidos para apoyar el metabolismo de los GR (por ejemplo, sustratos para la síntesis de glutatión y óxido nítrico); (f) generación de ROS; (g) administración de aminoácidos a tejido periférico; (h) defensas contra la adhesión vascular; (i) inflamación; o (j) estasis.

Definiciones

Los términos usados en las reivindicaciones y la memoria descriptiva se definen tal como se establece a continuación salvo que se especifique otra cosa.

Debe tenerse en cuenta que en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen los referentes plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "entidad de aminoácido" se refiere a un levo (L)-aminoácido en forma libre o forma de sal (o ambos), el resto de L-aminoácido en un péptido más pequeño de 20 restos de aminoácidos (por ejemplo, oligopéptido, por ejemplo, un dipéptido o un tripéptido), un derivado del aminoácido, un precursor del aminoácido o un metabolito del aminoácido (véase, por ejemplo, la Tabla 1). Una entidad de aminoácido incluye un derivado del aminoácido, un precursor del aminoácido, un metabolito del aminoácido o una forma de sal del aminoácido que es capaz de efectuar la funcionalidad biológica del L-aminoácido libre. Una entidad de aminoácido

no incluye un polipéptido o proteína de origen natural de más de 20 restos de aminoácidos, bien en forma completa o modificada, por ejemplo, en forma hidrolizada.

Las sales de aminoácidos incluyen cualquier sal que se puede ingerir. Para las composiciones farmacéuticas, la forma de sal de un aminoácido presente en la composición (por ejemplo, el Resto Activo) debería ser una sal farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo específico, la forma de sal es la forma de sal de hidrocloreuro (HCl) del aminoácido.

En algunas realizaciones, el derivado de una entidad de aminoácido comprende un éster de aminoácido (por ejemplo, un éster de alquilo, por ejemplo, un éster de etilo o un éster de metilo de una entidad de aminoácido) o un cetoácido.

Tabla 1. Las entidades de aminoácido incluyen aminoácidos, precursores, metabolitos y derivados de las composiciones descritas en el presente documento.

	Aminoácidos ilustrativos	Precursores	Metabolitos	Derivados
Leucina	L-Leucina	Oxo-leucina	HMB (beta-hidroxi-beta-metilbutirato) ; Oxo-leucina; Isovaleril-CoA	N-Acetil-Leucina
Arginina	L-Arginina	Argininosuccinato; Aspartato; Glutamato	Agmatina; Creatina	N-Acetil-Arginina

Glutamina	L-Glutamina	Glutamato	Glutamato	N-Acetil-Glutamina
NAC	N-Acetilcisteína	Serina; Acetilserina; Cistationina	Glutación; Cistationina; Homocisteína; Metionina	Cisteína; Cisteamina
Citrulina	L-Citrulina	- N-hidroxil-arginina	Argininosuccinato, Óxido nítrico	
Carnitina	L-Carnitina	6-N-trimetilisina; N6-Trimetil-3-OH-lisina		Acetil-L-Carnitina (ALCAR); Propionil-L-Carnitina (PLCAR); L-Carnitina L-Tartrato
Serina	L-Serina	Fosfoserina, P-hidroxipiruvato, L-Glicina	Glicina, Tryptófano, Acetilserina, Cistationina, Fosfatidilserina	
Valina	L-Valina	2-Oxo-valerato	Isobutril-CoA	N-Acetil-Valina

Histidina	L-Histidina	Histidinol; Histidinal; Ribosa-5- fosfato	Carnosina; Histamina; Urocanato	N-Acetil- Histidina
Lisina	L-Lisina	Diaminopimelato; Aspartato	Trimetilisina; Sacaropina	N-Acetil- Lisina
Glicina	L-Glicina	Serina, Sarcosina, Betaína, Dimetilglicina ,	Glutación, Serina, Creatina	

"Sobre" y "aproximadamente" significarán generalmente un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Los grados
5 ilustrativos de error están dentro del 15 por ciento (%), típicamente dentro del 10 % y más típicamente dentro del 5 % de un valor o intervalo de valores dado.

Un "aminoácido" se refiere a un compuesto orgánico que
10 tiene un grupo amino ($-NH_2$), un grupo de ácido carboxílico ($-C(=O)OH$) u una cadena lateral unida a través de un átomo de carbono central, e incluye aminoácidos esenciales y no esenciales y aminoácidos naturales no proteinogénicos y aminoácidos no naturales.

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "Resto Activo" significa una combinación de dos o más entidades de aminoácido que, en agregación, tienen la capacidad de tener un efecto biológico o terapéutico tal

como se describe en el presente documento, por ejemplo, un efecto sobre la función, el recambio o la síntesis de los eritrocitos; la función, el recambio o la síntesis de la hemoglobina; o la función vascular. Por ejemplo, un Resto

5 Activo puede reequilibrar una disfunción metabólica en un sujeto que padece una enfermedad o trastorno. Un Resto Activo de la invención puede contener otros ingredientes biológicamente activos. En algunos ejemplos, el Resto Activo comprende una combinación definida de cuatro o más

10 entidades de aminoácido, tal como se expone en detalle a continuación. En otras realizaciones, el Resto Activo consiste en una combinación definida de entidades de aminoácido, tal como se expone en detalle a continuación.

Las entidades de aminoácido individuales están

15 presentes en la composición, por ejemplo, Resto Activo, en diversas cantidades o proporciones, que se pueden presentar como una cantidad por peso (por ejemplo, en gramos), proporción por peso de entidad de aminoácidos entre sí, cantidad por mol, cantidad por porcentaje en peso de la

20 composición, cantidad por porcentaje en mol de la composición, contenido calórico, porcentaje de contribución calórica a la composición, etc. Generalmente, la presente divulgación proporcionará gramos de entidad de aminoácido en una forma de dosificación, porcentaje en peso de una

25 entidad de aminoácido en relación con el peso de la composición, es decir, el peso de todas las entidades de aminoácido y cualquier otro ingrediente biológicamente activo presente en la composición o en proporciones. En algunas realizaciones, la composición, por ejemplo, el

30 Resto Activo, se proporciona como una preparación farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un producto farmacéutico).

La expresión "cantidad eficaz", tal como se usa en el presente documento, significa una cantidad de un activo de la invención en una composición de la invención, en particular, una composición farmacéutica de la invención, que es suficiente para reducir un síntoma y/o mejorar una afección que se va a tratar (por ejemplo, proporcionar una respuesta clínica deseada). La cantidad eficaz de un activo para su uso en una composición variará con la afección particular que se esté tratando, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente, el activo particular que se está empleando, el(los) excipiente(s) y/o el(los) vehículo(s) particular(es) farmacéuticamente aceptable(s) utilizado, y factores similares con el conocimiento y la experiencia del médico tratante.

Una "composición farmacéutica" descrita en el presente documento comprende al menos un "Resto Activo" y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se usa como un agente terapéutico. Otras composiciones, que no necesitan cumplir los estándares farmacéuticos (GMP; componentes de grado farmacéutico) se pueden usar como un nutracéutico, un alimento médico o como un suplemento, estos se denominan "composiciones para la salud del consumidor".

La expresión "farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento, se refiere a aminoácidos, materiales, excipientes, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico sólido, adecuado para su uso en contacto con los tejidos de los seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o

complicación, acorde con una proporción beneficio/riesgo. En una realización específica, “farmacéuticamente aceptable” significa libre de endotoxina detectable o niveles de endotoxinas por debajo de los niveles aceptables en productos farmacéuticos.

En una realización específica, “farmacéuticamente aceptable” significa un estándar usado por la industria farmacéutica o por agencias o entidades (por ejemplo, agencias o entidades gubernamentales o comerciales) que regulan la industria farmacéutica para asegurar que uno o más parámetros de calidad del producto están dentro de los intervalos aceptables para un medicamento, composición farmacéutica, tratamiento u otro agente terapéutico. Un parámetro de calidad del producto puede ser cualquier parámetro regulado por la industria farmacéutica o por agencias o entidades, por ejemplo, agencias o entidades gubernamentales o comerciales, que incluyen pero sin limitación la composición; la uniformidad de la composición; la dosificación; la uniformidad de la dosificación; la presencia, ausencia y/o el nivel de contaminantes o impurezas; y el nivel de esterilidad (por ejemplo, la presencia, ausencia y/o el nivel de microbios). Las agencias reguladoras gubernamentales ilustrativas incluyen: Federal Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA), SwissMedic, China Food and Drug Administration (CFDA), o Japanese Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA).

La expresión “excipiente farmacéuticamente aceptable” se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica que no sea un activo, que es fisiológicamente compatible. Un excipiente farmacéuticamente aceptable puede incluir, pero sin limitación, un tampón, un edulcorante, un

potenciador de dispersión, un agente aromatizante, un agente enmascarador del sabor amargo, un colorante natural, un colorante artificial, un estabilizante, un disolvente o un conservante. En una realización específica, un
5 excipiente farmacéuticamente aceptable incluye uno o ambos de ácido cítrico o lecitina.

La expresión "componente de proteína de entidad no de aminoácido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido (por ejemplo, un polipéptido o un
10 oligopéptido), un fragmento del mismo o un péptido degradado. Los componentes de proteína de entidad no de aminoácido ilustrativos incluyen, pero sin limitación, uno o más de proteína del suero de la leche, proteína de clara de huevo, proteína de soja, caseína, proteína de cáñamo,
15 proteína de guisante, proteína de arroz marrón, o un fragmento o péptido degradado de las mismas.

La expresión "componente no de proteína", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier componente de una composición que no sea un componente de
20 proteína. Los componentes no de proteína ilustrativos pueden incluir, pero sin limitación, un sacárido (por ejemplo, un monosacárido (por ejemplo, dextrosa, glucosa o fructosa), un disacárido, un oligosacárido o un polisacárido); un lípido (por ejemplo, un lípido que
25 comprende azufre (por ejemplo, ácido alfa-lipoico), un triglicérido de cadena larga, un ácido graso omega 3 (por ejemplo, EPA, DHA, STA, DPA o ALA), un ácido graso omega 6 (GLA, DGLA o LA), un triglicérido de cadena media o un ácido graso de cadena media); una vitamina (por ejemplo,
30 vitamina A, vitamina E, vitamina C, vitamina D, vitamina B6, vitamina B12, biotina o ácido pantoténico); un mineral (zinc, selenio, hierro, cobre, folato, fósforo, potasio,

manganeso, cromo, calcio o magnesio); o un esteroide (por ejemplo, colesterol).

Una composición, formulación o producto es "terapéutico" si proporciona un efecto clínico deseado. Un efecto clínico deseado se puede demostrar mediante una reducción de la progresión de una enfermedad y/o el alivio de uno o más síntomas de la enfermedad.

Una "dosis unitaria" o "dosificación unitaria" comprende el producto del fármaco o productos del fármaco en la forma en la que se comercializan para su uso, con una mezcla específica de los componentes activos e inactivos (excipientes) en una configuración particular (por ejemplo, una cápsula dura) y distribuidos en una dosis particular (por ejemplo, en varios saquitos tubulares).

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento" de una hemoglobinopatía (por ejemplo, drepanocitosis) o una talasemia se refiere a mejorar una hemoglobinopatía o una talasemia (por ejemplo, retardar, detener o reducir el desarrollo de una hemoglobinopatía o una talasemia o al menos uno de los síntomas clínicos de las mismas); aliviar o mejorar al menos un parámetro físico incluyendo aquellos que no pueden ser discernibles por el paciente; y/o prevenir o retrasar la aparición o el desarrollo o la progresión de una hemoglobinopatía (por ejemplo, drepanocitosis) o una talasemia.

Un "tiempo suficiente" o "suficiente tiempo" tal como se usa en el presente documento en el contexto del mezclado significa un tiempo suficiente para lograr la mezcla y la uniformidad de la composición sin generar impurezas o inducir la heterogeneidad.

Una preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP, descrita en el presente documento, se puede formular como una "composición farmacéutica". Una composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento
5 comprende al menos una entidad de aminoácido, por ejemplo, un Resto Activo, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se usa como un agente terapéutico o un alimento médico. En algunas realizaciones, la
10 composición farmacéutica se usa como un nutracéutico o como un suplemento.

La expresión "grado farmacéutico" tal como se usa en el presente documento, se refiere a aminoácidos, materiales, excipientes, composiciones y/o formas de
15 dosificación que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de los seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una proporción beneficio/riesgo
20 razonable. En algunas realizaciones, el grado farmacéutico significa que los aminoácidos, materiales o excipientes cumplen las especificaciones de una monografía, por ejemplo, una monografía de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), el Formulario Nacional (NF), la Farmacopea
25 Británica (BP), la Farmacopea Europea (EP) o la Farmacopea Japonesa (JP) que detallan pruebas y criterios de aceptación. En algunas realizaciones, el significado del grado farmacéutico comprende que los aminoácidos, excipientes o materiales son al menos puros al 99 %.

30 Una preparación mezclada en seco, tal como se usa en el presente documento, significa una combinación de una pluralidad de entidades de aminoácidos que sustancialmente

carecen de agua. En algunas realizaciones, una preparación mezclada en seco es un polvo. En algunas realizaciones, una preparación mezclada en seco comprende menos de o igual al 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 % de agua en peso. En algunas realizaciones, una preparación mezclada en seco comprende al menos 4 entidades de aminoácido, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 entidades de aminoácido.

Una preparación mezclada en seco de grado farmacéutico (PGDBP, por sus siglas en inglés), tal como se usa en el presente documento, es una preparación mezclada en seco que cumple un estándar de referencia (por ejemplo, uno o más estándares de referencia) y comprende una pluralidad de entidades de aminoácido de grado farmacéutico. Una PGDBP se puede formular como una composición farmacéutica, por ejemplo, la PGDBP puede comprender además uno o más excipientes y/o componentes de administración oral. En algunas realizaciones, un estándar de referencia cumplido por una PGDBP es la uniformidad de la composición.

La uniformidad de la composición, tal como se usa en el presente documento, es un estándar para la homogeneidad de un componente de una combinación, por ejemplo, una preparación mezclada en seco, por ejemplo, una PGDBP que comprende uniformidad de la mezcla, uniformidad de porción o ambos. En algunas realizaciones, una combinación cumple un estándar para la uniformidad de la composición, por ejemplo, uniformidad de la mezcla, si la cantidad de un componente (por ejemplo, una entidad de aminoácido de grado farmacéutico, excipiente o componente de administración oral) en un punto de muestreo en la combinación difiere de un valor de referencia en menos de una cantidad predeterminada. En algunas realizaciones, el valor de

referencia es la cantidad del componente en un segundo punto de muestreo en la combinación. En algunas realizaciones, el valor de referencia es la cantidad del componente (por ejemplo, una entidad de aminoácido de grado farmacéutico, excipiente, o componente de administración oral) presente en la combinación (por ejemplo, una preparación mezclada en seco, por ejemplo, una PGDBP).

En algunas realizaciones, en donde una combinación (por ejemplo, una preparación mezclada en seco, por ejemplo, una PGDBP) se divide en porciones, las porciones de la combinación cumplen un estándar para la uniformidad de la composición, por ejemplo, uniformidad de porción, si la cantidad de un componente (por ejemplo, una entidad de aminoácido de grado farmacéutico, excipiente o componente de administración oral) en una porción difiere de un valor de referencia en menos de una cantidad predeterminada. En algunas realizaciones, el valor de referencia es la cantidad del componente en una segunda porción. En algunas realizaciones, el valor de referencia comprende la cantidad del componente en N porciones adicionales, en donde n es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100. En algunas realizaciones, el valor de referencia es la cantidad del componente (por ejemplo, una entidad de aminoácido de grado farmacéutico, excipiente, o componente de administración oral) presente en la combinación (por ejemplo, una preparación mezclada en seco, por ejemplo, una PGDBP). Las cantidades pueden ser absolutas (por ejemplo, masa o peso) o relativas (por ejemplo, porcentaje de componentes totales). En algunas realizaciones, la cantidad predeterminada puede ser el 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o el 1 %, por ejemplo, del valor de referencia. En

algunas realizaciones, la cantidad predeterminada es el 10 % (por ejemplo, la cantidad del componente difiere del valor de referencia en menos del 10 %).

Porcionar, tal como se usa en el presente documento, significa dividir todo o parte de la preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP, en porciones para la administración a un paciente o sujeto. Las porciones creadas por porcionamiento se pueden proporcionar en sacos, viales u otros recipientes, por ejemplo, saquitos tubulares. En una realización, las porciones creadas por porcionamiento son cantidades de dosificación unitaria, por ejemplo, una dosificación unitaria o una fracción de una dosificación unitaria (por ejemplo, un saquito tubular puede comprender la mitad de una dosis unitaria, de tal manera que dos saquitos tubulares se usarían juntos para proporcionar una única dosis unitaria). En algunas realizaciones, solo las PGDBP (por ejemplo, que cumple un estándar de referencia) se separan en porciones mediante porcionamiento. En algunas realizaciones, las porciones generadas por porcionamiento también cumplen un estándar de referencia.

Composiciones que comprenden entidades de aminoácidos (por ejemplo, restos activos)

La composición de la invención tal como se describen en el presente documento (un Resto Activo) comprende entidades de aminoácido, por ejemplo, las entidades de aminoácido mostradas en la Tabla 1. En algunas realizaciones, la composición comprende: a) una entidad de aminoácido de leucina, b) una entidad de aminoácido de arginina, c) entidad de aminoácido de glutamina; d) una entidad de N-acetilcisteína (NAC); y e) una entidad de

aminoácido de glicina. En algunas realizaciones, la composición comprende: a) una entidad de aminoácido de leucina, b) una entidad de aminoácido de arginina, c) entidad de aminoácido de glutamina; d) una entidad de NAC; y e) una entidad de carnitina. En algunas realizaciones, la composición comprende: a) una entidad de aminoácido de leucina, b) una entidad de aminoácido de arginina, c) entidad de aminoácido de glutamina; d) una entidad de NAC; y e) una entidad de aminoácido de glicina y una entidad de carnitina. En algunas realizaciones, la composición comprende además una, dos o más (por ejemplo, todas) de (f) una entidad de aminoácido de valina, (g) una entidad de aminoácido de histidina, o (h) una entidad de aminoácido de lisina.

En algunas realizaciones, la composición comprende: (a) uno o ambos de una entidad de aminoácido de citrulina o una entidad de aminoácido de arginina y (b) una entidad de NAC. En algunas realizaciones, la composición comprende además uno o ambos de una entidad de carnitina o una entidad de aminoácido de glutamina. En algunas realizaciones, la composición comprende además una, dos, tres, cuatro o más (por ejemplo, todas) de una entidad de aminoácido de leucina, una entidad de aminoácido de histidina, una entidad de aminoácido de lisina, una entidad de aminoácido de valina o una entidad de aminoácido de serina.

En ciertas realizaciones, la entidad de aminoácido de leucina se elige de L-leucina, β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB), oxo-leucina (α -cetoisocaproato (KIC)), isovaleril-CoA, n-acetil-leucina o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, la entidad de aminoácido de arginina se elige de L-arginina, creatina,

argininosuccinato, aspartato, glutamato, agmatina, N-acetil-arginina o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, la entidad de aminoácido de glutamina se elige de L-glutamina, glutamato, carbamoil-P,
5 n-acetilglutamina o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, la entidad de aminoácido de NAC se elige de NAC, serina, acetilserina, cistationina, homocisteína, glutatión o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, la entidad de aminoácido de
10 citrulina se elige de L-citrulina, ornitina, carbamoil-P, carbamoil-P y ornitina, N-hidroxil-arginina, arginosuccinato, óxido nítrico o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, la entidad de carnitina se
15 elige de L-carnitina, 6-N-trimetilisina, N6-trimetil-3-OH-lisina, acetil-L-carnitina, propionil-L-carnitina, L-carnitina, L-tartrato o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, la entidad de aminoácido de serina se elige de L-serina, fosfoserina, p-
20 hidroxipiruvato, L-glicina, acetilserina, cistationina, fosfatidilserina o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, la entidad de aminoácido de glicina se elige de L-glicina, L-serina, sarcosina, betaína, dimetilglicina, glutatión, creatina o una
25 combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, la entidad de aminoácido de valina se elige de L-valina, 2-oxo-valerato, isobutril-CoA, N-acetil-valina o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, la entidad de aminoácido de
30 histidina se elige de L-histidina, histidinol, histidinal, ribosa-5-fosfato, carnosina, histamina, urocanato, N-acetil-histidina o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, la entidad de aminoácido de lisina se elige de L-lisina, diaminopimelato, aspartato, trimetilisina, sacaropina, N-acetil-lisina o una combinación de los mismos.

5 En algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más (por ejemplo, todas) de (a)-(h) están en forma de aminoácido libre en la composición, por ejemplo, al menos: 42 % en peso, 75 % en peso o 90 % en peso del peso total de los componentes de entidad de
10 aminoácido o del total de componentes es una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más (por ejemplo, todas) de (a)-(h) en forma de aminoácido libre en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro,
15 cinco, seis, siete o más (por ejemplo, todas) de (a)-(h) están en forma de sal en la composición, por ejemplo, al menos el: 0.01 % en peso, 0.1 % en peso, 0.5 % en peso, 1 % en peso, 5 % en peso o 10 % en peso o más del peso total de los componentes de entidad de aminoácido o del total de
20 componentes es una, dos, tres, cuatro, cinco o más (por ejemplo, todas) de (a)-(f) en forma de sal en la composición.

En algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más (por ejemplo, todas) de (a)-(h) se
25 proporciona como parte de un dipéptido o tripéptido, por ejemplo, en una cantidad de al menos el: 0.01 % en peso, 0.1 % en peso, 0.5 % en peso, 1 % en peso, 5 % en peso, o 10 % en peso o más de componentes de entidad de aminoácido o del total de los componentes de la composición.

30 En algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más (por ejemplo, todas) de (a)-(j) están en forma de aminoácido libre en la

composición, por ejemplo, al menos el: 42 % en peso, 45 % en peso, 50 % en peso, 55 % en peso, 60 % en peso, 65 % en peso, 70 % en peso, 75 % en peso, 80 % en peso, 85 % en peso, 90 % en peso, 95 % en peso, 97 % en peso, 98 % en peso o más del peso total de la composición (por ejemplo, en forma seca) es una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más (por ejemplo, todas) de (a)-(j) en forma de aminoácido libre en la composición.

En algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más (por ejemplo, todas) de (a)-(j) están en forma de sal en la composición, por ejemplo, al menos el: 0.01 % en peso, 0.1 % en peso, 0.5 % en peso, 1 % en peso, 2 % en peso, 3 % en peso, 4 % en peso, 5 % en peso, 6 % en peso, 7 % en peso, 8 % en peso, 9 % en peso, o 10 % en peso o más del peso total de la composición (por ejemplo, en forma seca) es una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más (por ejemplo, todas) de (a)-(j) en forma de sal en la composición.

En algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más (por ejemplo, todas) de (a)-(j) se proporcionan como parte de un dipéptido o tripéptido, por ejemplo, en una cantidad de al menos el: 0.01 % en peso, 0.1 % en peso, 0.5 % en peso, 1 % en peso, 2 % en peso, 3 % en peso, 4 % en peso, 5 % en peso, 6 % en peso, 7 % en peso, 8 % en peso, 9 % en peso o 10 % en peso o más, o más de componentes de entidad de aminoácido o del total de componentes de la composición.

En ciertas realizaciones, la composición (por ejemplo, el Resto Activo) es capaz de reducir o reduce la inflamación en al menos el 60 %, 75 % o el 90 %, tal como se detecta usando un ensayo de IL-6, por ejemplo, en células de macrófagos, por ejemplo, usando un ensayo de

detección basado en anticuerpos, por ejemplo, un ELISA, por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 1, por ejemplo, en relación con una composición de referencia (por ejemplo, un vehículo de control; una composición de aminoácido que comprende L-leucina, L-isoleucina, L-valina; una composición de aminoácido que comprende L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-arginina y L-glutamina; L-arginina sola; L-glutamina sola; L-leucina sola; o L-valina sola).

En ciertas realizaciones, la composición (por ejemplo, el Resto Activo) es capaz de reducir o reduce la inflamación en al menos el 60 %, 75 % o 90 %, tal como se detecta usando un ensayo de TNF α , por ejemplo, en células de macrófago, por ejemplo, usando un ensayo de detección basado en anticuerpos, por ejemplo, un ELISA, por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 1, por ejemplo, en relación con una composición de referencia (por ejemplo, un control de vehículo; una composición de aminoácido que comprende L-leucina, L-isoleucina, L-valina; una composición de aminoácido que comprende L-arginina, L-glutamina y NAC; una composición de aminoácido que comprende L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-arginina y L-glutamina; valina; glutamina; arginina; isoleucina; leucina; o NAC).

I. Cantidades

Una composición ilustrativa (por ejemplo, un Resto Activo) puede incluir 1.2 g de una entidad de aminoácido de leucina; 1.5 g de una entidad de aminoácido de arginina; 3.67 g de una entidad de aminoácido de glutamina; 0.4 g de una entidad de NAC; 0.33 g de una entidad de carnitina; 0.9 g de una entidad de aminoácido de glicina; 0.6 g de una entidad de aminoácido de valina; 0.6 g de una entidad de

aminoácido de histidina; y 0.6 g de una entidad de
 aminoácido de lisina (véase, por ejemplo, g/dosis en la
 Tabla 2). Una composición ilustrativa puede incluir 0.6 g
 de una entidad de aminoácido de leucina; 0.75 g de una
 5 entidad de aminoácido de arginina; 1.83 g de una entidad de
 aminoácido de glutamina; 0.2 g de una entidad de NAC; 0.17
 g de una entidad de carnitina; 0.45 g de una entidad de
 aminoácido de glicina; 0.3 g de una entidad de aminoácido
 de valina; 0.3 g de una entidad de aminoácido de histidina;
 10 y 0.3 g de una entidad de aminoácido de lisina

**Tabla 2. Composición ilustrativa que comprende los
 aminoácidos (por ejemplo, un Resto Activo).**

Aminoácido	Dosis (g)	Diaria total	Proporción en peso	% en peso
L-leucina	3.6	7.2	3.6	12.24
L-arginina	4.5	9	4.5	15.31
L-glutamina	11	22	11	37.41
NAC	1.2	2.4	1.2	4.08
L-carnitina	1	2	1	3.40
L-glicina	2.7	5.4	2.7	9.18
L-valina	1.8	3.6	1.8	6.12
L-histidina	1.8	3.6	1.8	6.12
L-lisina	1.8	3.6	1.8	6.12
Aminoácidos totales	29.4	58.8		

15

En algunas realizaciones, la composición incluye 1.2 g
 +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de leucina; 1.5 g
 +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de arginina; 3.67
 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de glutamina;
 20 0.4 g de una entidad de NAC; 0.33 g +/- el 20 % de una

entidad de carnitina; 0.9 +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de glicina; 0.6 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de valina; 0.6 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de histidina; y 0.6 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de lisina. En algunas realizaciones, la composición incluye 1.2 g +/- el 15% de una entidad de aminoácido de leucina; 1.5 g +/- el 15% de una entidad de aminoácido de arginina; 3.67 g +/- el 15% de una entidad de aminoácido de glutamina; 0.4 g de una entidad de NAC; 0.33 g +/- el 15% de una entidad de carnitina; 0.9 +/- el 15% de una entidad de aminoácido de glicina; 0.6 g +/- el 15% de una entidad de aminoácido de valina; 0.6 g +/- el 15% de una entidad de aminoácido de histidina; y 0.6 g +/- el 15% de una entidad de aminoácido de lisina. En algunas realizaciones, la composición incluye 1.2 g +/- el 10% de una entidad de aminoácido de leucina; 1.5 g +/- el 10% de una entidad de aminoácido de arginina; 3.67 g +/- el 10% de una entidad de aminoácido de glutamina; 0.4 g de una entidad de NAC; 0.33 g +/- el 10% de una entidad de carnitina; 0.9 +/- el 10% de una entidad de aminoácido de glicina; 0.6 g +/- el 10% de una entidad de aminoácido de valina; 0.6 g +/- el 10% de una entidad de aminoácido de histidina; y 0.6 g +/- el 10 % de una entidad de aminoácido de lisina. En algunas realizaciones, la composición incluye 1.2 g +/- el 5% de una entidad de aminoácido de leucina; 1.5 g +/- el 5% de una entidad de aminoácido de arginina; 3.67 g +/- el 5% de una entidad de aminoácido de glutamina; 0.4 g de una entidad de NAC; 0.33 g +/- el 5% de una entidad de carnitina; 0.9 +/- el 5% de una entidad de aminoácido de glicina; 0.6 g +/- el 5% de una entidad de aminoácido de valina; 0.6 g +/- el 5% de una entidad de

aminoácido de histidina; y 0.6 g +/- el 5% de una entidad de aminoácido de lisina.

En algunas realizaciones, la composición incluye 0.6 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de leucina; 0.75 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de arginina; 1.83 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de glutamina; 0.2 g +/- el 20 % de una entidad de NAC; 0.17 g +/- el 20 % de una entidad de carnitina; 0.45 +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de glicina; 0.3 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de valina; 0.3 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de histidina; y 0.3 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de lisina. En algunas realizaciones, la composición incluye 0.6 g +/- el 15% de una entidad de aminoácido de leucina; 0.75 g +/- el 15% de una entidad de aminoácido de arginina; 1.83 g +/- el 15% de una entidad de aminoácido de glutamina; 0.2 g +/- el 15% de una entidad de NAC; 0.17 g +/- el 15% de una entidad de carnitina; 0.45 +/- el 15% de una entidad de aminoácido de glicina; 0.3 g +/- el 15% de una entidad de aminoácido de valina; 0.3 g +/- el 15% de una entidad de aminoácido de histidina; y 0.3 g +/- el 15% de una entidad de aminoácido de lisina. En algunas realizaciones, la composición incluye 0.6 g +/- el 10% de una entidad de aminoácido de leucina; 0.75 g +/- el 10% de una entidad de aminoácido de arginina; 1.83 g +/- el 10% de una entidad de aminoácido de glutamina; 0.2 g +/- el 10% de una entidad de NAC; 0.17 g +/- el 10% de una entidad de carnitina; 0.45 +/- el 10% de una entidad de aminoácido de glicina; 0.3 g +/- el 10% de una entidad de aminoácido de valina; 0.3 g +/- el 10% de una entidad de aminoácido de histidina; y 0.3 g +/- el 10% de una entidad de aminoácido de lisina. En algunas realizaciones, la composición incluye 0.6 g +/- el 5% de

una entidad de aminoácido de leucina; 0.75 g +/- el 5% de una entidad de aminoácido de arginina; 1.83 g +/- el 5% de una entidad de aminoácido de glutamina; 0.2 g +/- el 5% de una entidad de NAC; 0.17 g +/- el 5% de una entidad de carnitina; 0.45 +/- el 5% de una entidad de aminoácido de glicina; 0.3 g +/- el 5% de una entidad de aminoácido de valina; 0.3 g +/- el 5% de una entidad de aminoácido de histidina; y 0.3 g +/- el 5% de una entidad de aminoácido de lisina

10

ii. Proporciones

Una composición ilustrativa puede incluir una proporción en peso (peso) de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, la entidad de aminoácido de glutamina, y la entidad de NAC de 3.6: 4.5: 11: 1.2. En algunas realizaciones, la proporción en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, la entidad de aminoácido de glutamina y la entidad de NAC es 3.6 +/-15%: 4.5 +/-15%: 11 +/-15%: 1.2 +/-15%. En algunas realizaciones, la proporción en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, la entidad de aminoácido de glutamina y la entidad de NAC es 3.6 +/-10%: 4.5 +/-10%: 11 +/-10%: 1.2 +/-10%. En algunas realizaciones, la proporción en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, la entidad de aminoácido de glutamina y la entidad de NAC es 3.6 +/-5%: 4.5 +/-5%: 11 +/-5%: 1.2 +/-5%.

Una composición ilustrativa puede incluir una proporción en peso (peso) de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, la entidad de aminoácido de glutamina, la entidad de NAC, la entidad

de carnitina y la entidad de aminoácido de glicina es 3.6: 4.5: 11: 1.2: 1: 2.7. En algunas realizaciones, la proporción en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, la entidad de aminoácido de glutamina, la entidad de NAC, la entidad de carnitina y la entidad de aminoácido de glicina es 3.6 +/- 15%: 4.5 +/-15%: 11 +/-15%: 1.2 +/-15%: 1 +/-15%: 2.7 +/-15%. En algunas realizaciones, la proporción en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, la entidad de aminoácido de glutamina, la entidad de NAC, la entidad de carnitina y la entidad de aminoácido de glicina es 3.6 +/-10%: 4.5 +/-10%: 11 +/-10%: 1.2 +/-10%: 1 +/-10%: 2.7 +/-10%. En algunas realizaciones, la proporción en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, la entidad de aminoácido de glutamina, la entidad de NAC, la entidad de carnitina y la entidad de aminoácido de glicina es 3.6 +/-5%: 4.5 +/-5%: 11 +/-5%: 1.2 +/-5%: 1 +/-5%: 2.7 +/-5%.

20 *iii. Relaciones de entidades de aminoácidos*

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, la entidad de aminoácido de glutamina, y la entidad de NAC es al menos el: 40 % en peso, 50 % en peso o 60 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 80 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de

arginina, la entidad de aminoácido de glutamina, la entidad de NAC, la entidad de carnitina y la entidad de glicina es al menos el: 50 % en peso, 60 % en peso o 70 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los
5 componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 95 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

10 En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de NAC es al menos el: 2 % en peso, 3 % en peso o 4 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 10 % en peso de los
15 componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, la entidad de aminoácido de glutamina está presente en un % en peso mayor de una, dos o
20 más (por ejemplo, todas) de cualquier otra entidad de aminoácido, componente de proteína de entidad de aminoácido o componente no de proteína en la composición (por ejemplo, en forma seca). En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de glutamina es al menos el: 20 %
25 en peso, 30 % en peso o 35 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 70 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por
30 ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de carnitina es al menos el: 1 % en peso, 2 % en peso o 3 %

en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 10 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de glicina es al menos el: 3 % en peso, 5 % en peso o 7 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 20 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de glutamina en la composición (por ejemplo, en forma seca) es mayor que el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina, por ejemplo, el % en peso de la entidad de aminoácido de glutamina en la composición (por ejemplo, en forma seca) es al menos el 30 % mayor que el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina, por ejemplo, el % en peso de la entidad de aminoácido de glutamina es al menos el 40 %, 50 % o 60 % mayor que el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina.

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de glutamina en la composición (por ejemplo, en forma seca) es mayor que el % en peso de la entidad de aminoácido de arginina, por ejemplo, el % en peso de la entidad de aminoácido de glutamina en la composición (por ejemplo, en forma seca) es al menos el 25% mayor que el % en peso de la entidad de aminoácido de arginina, por ejemplo, el % en peso de la entidad de aminoácido de

glutamina es al menos el 35%, 45% o 55% mayor que el % en peso de la entidad de aminoácido de arginina.

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de glicina en la composición (por ejemplo, en forma seca) es mayor que el % en peso de la entidad de carnitina, por ejemplo, el % en peso de la entidad de aminoácido de glicina en la composición (por ejemplo, en forma seca) es al menos el 30 % mayor que el % en peso de la entidad de carnitina, por ejemplo, el % en peso de la entidad de aminoácido de glicina es al menos el 40 %, 50 % o 60 % mayor que el % en peso de la entidad de carnitina.

iv. Moléculas de aminoácido para excluir o limitar de la composición

En algunas realizaciones, la composición no comprende un péptido de más de 20 restos de aminoácidos de longitud (por ejemplo, suplemento de proteína) elegidos de o que provienen de una, dos, tres, cuatro, cinco o más (por ejemplo, todas) de proteína de clara de huevo, proteína de soja, caseína, proteína de cáñamo, proteína de guisante o proteína de arroz marrón, o si el péptido está presente, el péptido está presente en menos del: 10 % en peso (peso), 5 % en peso, 1 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso del peso total de los componentes de proteína de la entidad no de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, la composición comprende una combinación de 3 a 18, 3 a 16, o 3 a 14 entidades de aminoácidos diferentes, por ejemplo, la combinación comprende al menos el: 42 % en peso, 75 % en peso o 90 % en peso del % en peso total de los componentes de la entidad

de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, los dipéptidos o las sales de los mismos o los tripéptidos o las sales de los mismos
5 están presentes en menos del: 10 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos del peso total de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

10 En algunas realizaciones, al menos el 50 %, 60 %, 70 % o más de los gramos totales de los componentes de entidad de aminoácido en la composición (por ejemplo, en forma seca) son de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más (por ejemplo, todas) de (a)-(h).

15 En algunas composiciones, al menos: 50 %, 60 %, 70 % o más de las calorías de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca) son de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más (por ejemplo, todas) de (a)-(h).

20 En algunas realizaciones, el triptófano está ausente de la composición, o si está presente, está presente en menos del: 10 % en peso, 9 % en peso, 8 % en peso, 7 % en peso, 6 % en peso, 5 % en peso, 4 % en peso, 3 % en peso, 2 % en peso, 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05
25 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos, por ejemplo, del peso total de la composición (por ejemplo, en forma seca). En algunas realizaciones, el triptófano, si está presente, está presente en forma libre. En algunas realizaciones, el triptófano, si está presente, está
30 presente en forma de sal. En algunas realizaciones, el triptófano, si está presente, puede estar presente en un oligopéptido, polipéptido o proteína, con la condición de

que la proteína no sea proteína del suero de la leche, caseína, lactalbúmina o cualquier otra proteína usada como un suplemento nutricional, alimento médico o producto similar, si están presentes como proteína intacta o como

5 hidrolizado de proteína. En algunas realizaciones, la metionina está ausente de la composición, o si está presente, está presente en menos del: 10 % en peso, 5 % en peso, 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos, por ejemplo,

10 del peso total de la composición (en forma seca). En algunas realizaciones, la prolina está ausente de la composición, o si está presente, está presente en menos del: 10 % en peso, 5 % en peso, 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en

15 peso o menos, por ejemplo, del peso total de la composición (en forma seca). En algunas realizaciones, una, dos o tres de metionina, prolina triptófano están ausentes de la composición, o si está presentes, está presentes en menos del: 10 % en peso, 5 % en peso, 1 % en peso, 0.5 % en peso,

20 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos, por ejemplo, del peso total de la composición (en forma seca).

En algunas realizaciones, un carbohidrato (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho,

25 nueve, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 de dextrosa, maltodextrosa, sacarosa, dextrina, fructosa, galactosa, glucosa, glucógeno, jarabe de maíz alto en fructosa, miel, inositol, azúcar invertido, lactosa, levulosa, maltosa, melaza, caña de azúcar o xilosa) está ausente de la

30 composición, o si está presente, está presente en menos del: 10 % en peso, 5 % en peso, 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en

peso o menos, por ejemplo, del peso total de la composición (en forma seca).

En algunas realizaciones, una vitamina (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C o vitamina D) está ausente de la composición, o si está presente, está presente en menos del: 10 % en peso, 5 % en peso, 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos, por ejemplo, del peso total de la composición (en forma seca).

En algunas realizaciones, una o ambos de nitrato o nitrito están ausentes de la composición, o si están presentes, están presentes en menos del: 10 % en peso, 5 % en peso, 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos, por ejemplo, del peso total de la composición (en forma seca).

En algunas realizaciones, 4-hidroxiisoleucina está ausente de la composición, o si está presente, está presente en menos del: 10 % en peso, 5 % en peso, 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos, por ejemplo, del peso total de la composición (en forma seca).

En algunas realizaciones, un probiótico (por ejemplo, un probiótico de *Bacillus*) está ausente de la composición, o si está presente, está presente en menos del: 10 % en peso, 5 % en peso, 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos, por ejemplo, del peso total de la composición (en forma seca).

En algunas realizaciones, el fenilacetato está ausente de la composición, o si está presente, está presente en

menos del: 10 % en peso, 5 % en peso, 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos, por ejemplo, del peso total de la composición (en forma seca).

5 En algunas realizaciones, la gelatina (por ejemplo, una cápsula de gelatina) está ausente de la composición, o si está presente, está presente en menos del: 10 % en peso, 5 % en peso, 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos,
10 por ejemplo, del peso total de la composición (en forma seca).

 En algunas realizaciones, una, dos o tres de S-alilcisteína, S-alilmercaptocisteína o fructosil-arginina están ausentes de la composición, o si está presentes, está
15 presentes en menos del: 10 % en peso, 5 % en peso, 1 % en peso, 0.5 % en peso, 0.1 % en peso, 0.05 % en peso, 0.01 % en peso, 0.001 % en peso o menos, por ejemplo, del peso total de la composición (en forma seca).

20 V. Cantidades y proporciones

 Una composición ilustrativa (por ejemplo, un Resto Activo) puede incluir 0.6 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de leucina, 1.4 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de arginina, 1.5 g +/- el 20 % de una entidad de
25 aminoácido de glutamina, 0.26 g +/- el 20 % de una entidad de NAC, 0.2 g +/- el 20 % de una entidad de carnitina, 0.75 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de serina, 0.3 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de valina, 0.3 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de histidina, 0.3
30 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de lisina, y 0.9 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de citrulina

(véase, por ejemplo, g/saquito tubular para 5 saquitos tubulares administrados dos veces al día en la Tabla 3).

Tabla 3. Composición ilustrativa que comprende los aminoácidos (por ejemplo, un Resto Activo).

Aminoácido	Saquito tubular (g) (5 saquitos tubulares BID)	Saquito tubular (g) (4 saquitos tubulares BID)	Saquito tubular (g) (3 saquitos tubulares BID)	Dosis (g)	Diaría total	Proporción en peso	% en peso
L-leucina	0.6	0.75	1	3	6	3	9.22 %
L-arginina	1.4	1.75	2.33	7	14	7	21.5 1%
L-glutamina	1.5	1.875	2.5	7.5	15	7.5	23.0 4%
N-acetilcisteína	0.26	0.325	0.43	1.3	2.6	1.3	3.99 %
L-carnitina	0.2	0.25	0.33	1	2	1	3.07 %
L-serina	0.75	0.9375	1.25	3.75	7.5	3.75	11.5 2%
L-valina	0.3	0.375	0.5	1.5	3	1.5	4.61 %
L-histidina	0.3	0.375	0.5	1.5	3	1.5	4.61 %
L-lisina	0.3	0.375	0.5	1.5	3	1.5	4.61 %
L-citrulina	0.9	1.125	1.5	4.5	9	4.5	13.8 2%
Aminoácidos totales	6.51	8.1375	10.85	32.5 5	65.1		100%

Una composición ilustrativa (por ejemplo, un Resto Activo) puede incluir 0.75 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de leucina; 1.75 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de arginina; 1.875 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de glutamina; 0.325 g +/- el 20 % de una entidad de NAC; 0.25 g +/- el 20 % de una entidad de carnitina; 0.9375 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de serina; 0.375 g +/- el 20 % de una entidad de

aminoácido de valina; 0.375 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de histidina; y 0.375 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de lisina y 1.125 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de citrulina (véase, por ejemplo, g/saquito tubular para 4 saquitos tubulares administrados dos veces al día en la Tabla 3).

Una composición ilustrativa (por ejemplo, un Resto Activo) puede incluir 1 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de leucina; 2.33 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de arginina; 2.5 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de glutamina; 0.43 g +/- el 20 % de una entidad de NAC; 0.33 g +/- el 20 % de una entidad de carnitina; 1.25 +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de serina; 0.5 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de valina; 0.5 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de histidina, 0.5 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de lisina y 1.5 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de citrulina (véase, por ejemplo, g/saquito tubular para 3 saquitos tubulares administrados dos veces al día en la Tabla 3).

Una composición ilustrativa (por ejemplo, un Resto Activo) puede incluir 3 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de leucina, 7 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de arginina, 7.5 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de glutamina, 1.3 g +/- el 20 % de una entidad de NAC, 1 g +/- el 20 % de una entidad de carnitina, 3.75 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de serina, 1,5 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de valina, 1.5 g +/- el 20 % de aminoácido de histidina, 1.5 +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de lisina, 4.5 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de citrulina (véase, por ejemplo, g/dosis administrada dos veces al día en la Tabla 3).

Una composición ilustrativa (por ejemplo, un Resto Activo) puede incluir 6 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de leucina, 14 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de arginina, 15 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de glutamina, 2.6 g +/- el 20 % de una entidad de NAC, 2 g +/- el 20 % de una entidad de carnitina, 7.5 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de serina, 3 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de valina, 3 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de histidina, 3 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de lisina, y 9 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de citrulina (véase, por ejemplo, el diario total en la Tabla 3).

Una composición ilustrativa puede incluir una proporción en peso (peso) de una entidad de aminoácido de leucina, una entidad de aminoácido de arginina, una entidad de aminoácido de glutamina, una entidad de NAC, una entidad de carnitina, una entidad de aminoácido de serina, una entidad de aminoácido de valina, una entidad de aminoácido de histidina, una entidad de aminoácido de lisina y una entidad de aminoácido de citrulina de 3 +/- el 15 %: 7 +/- 15%: 7.5 +/- 15%: 1.3 +/- 15%: 1 +/- 15%: 3.75 +/- 15%: 1.5 +/- 15%: 1.5 +/- 15%: 1.5 +/- 15%: 4.5 +/- 15% (véase, por ejemplo, la proporción en peso en la Tabla 3).

Una composición ilustrativa (por ejemplo, un Resto Activo) puede incluir 0.35 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de leucina, 0.8 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de arginina, 1 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de glutamina, 0.18 g +/- el 20 % de una entidad de NAC, 0.2 g +/- el 20 % de una entidad de carnitina, 0.43 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de serina, 0.18 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de valina, 0.18 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de histidina,

0.18 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de lisina, y 0.52 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de citrulina (véase, por ejemplo, g/saquito tubular para 5 saquitos tubulares administrados dos veces al día en la

5 Tabla 4A).

Tabla 4A. Composición ilustrativa que comprende los aminoácidos (por ejemplo, un Resto Activo).

Aminoácido	Saquito tubular (g) (5 saquitos tubulares BID)	Saquito tubular (g) (4 saquitos tubulares BID)	Saquito tubular (g) (3 saquitos tubulares BID)	Dosis (g)	Diaria total	Proporción en peso	% en peso
L-leucina	0.35	0.44	0.58	1.75	3.5	1.94	8.71%
L-arginina	0.8	1	1.33	4	8	4.44	19.90%
L-glutamina	1	1.25	1.67	5	10	5.56	24.88%
N-acetilcisteína	0.18	0.23	0.3	0.9	1.8	1	4.48%
L-carnitina	0.2	0.25	0.33	1	2	1.11	4.98%
L-serina	0.43	0.54	0.72	2.15	4.3	2.39	10.70%
L-valina	0.18	0.23	0.3	0.9	1.8	1	4.48%
L-histidina	0.18	0.23	0.3	0.9	1.8	1	4.48%
L-lisina	0.18	0.23	0.3	0.9	1.8	1	4.48%
L-citrulina	0.52	0.65	0.87	2.6	5.2	2.89	12.94%
Aminoácidos totales	4.02	5.025	6.7	20.1	40.2		100%

10

Una composición ilustrativa (por ejemplo, un Resto Activo) puede incluir 0.44 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de leucina, 1 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de arginina, 1.25 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de glutamina, 0.23 g +/- el 20 % de una entidad de NAC, 0.25 g +/- el 20 % de una entidad de carnitina, 0.54 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de serina, 0.23 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido

15

de valina, 0.23 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de histidina, 0.23 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de lisina, y 0.65 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de citrulina (véase, por ejemplo, g/saquito tubular para 4 saquitos tubulares administrados dos veces al día en la Tabla 4A).

Una composición ilustrativa (por ejemplo, un Resto Activo) puede incluir 0.58 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de leucina, 1.33 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de arginina, 1,67 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de glutamina, 0.3 g +/- el 20 % de una entidad de NAC, 0.33 g +/- el 20 % de una entidad de carnitina, 0.72 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de serina, 0.3 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de valina, 0.3 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de histidina, 0.3 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de lisina, y 0.87 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de citrulina (véase, por ejemplo, g/saquito tubular para 3 saquitos tubulares administrados dos veces al día en la Tabla 4A).

Una composición ilustrativa (por ejemplo, un Resto Activo) puede incluir 1,75 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de leucina, 4 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de arginina, 5 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de glutamina, 0.9 g +/- el 20 % de una entidad de NAC, 1 g +/- el 20 % de una entidad de carnitina, 2.15 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de serina, 0,9 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de valina, 0,9 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de histidina, 0,9 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de lisina, y 2,6 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de citrulina (véase, por ejemplo, g/dosis en la Tabla 4A).

Una composición ilustrativa (por ejemplo, un Resto Activo) puede incluir 3,5 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de leucina, 8 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de arginina, 10 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de glutamina, 1.8 g +/- el 20 % de una entidad de NAC, 2 g +/- el 20 % de una entidad de carnitina, 4.3 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de serina, 1,8 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de valina, 1,8 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de histidina, 1,8 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de lisina, y 5,2 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de citrulina (véase, por ejemplo, el diario total en la Tabla 4A).

Una composición ilustrativa puede incluir una proporción en peso (peso) de una entidad de aminoácido de leucina, una entidad de aminoácido de arginina, una entidad de aminoácido de glutamina, una entidad de NAC, una entidad de carnitina, una entidad de aminoácido de serina, una entidad de aminoácido de valina, una entidad de aminoácido de histidina, una entidad de aminoácido de lisina y una entidad de aminoácido de citrulina de 1,94 +/- el 15 %: 4.44 +/-15%: 5.56 +/-15%: 1 +/-15%: 1.11 +/-15%: 2.39 +/-15%: 1 +/-15%: 1 +/-15%: 1 +/-15%: 2.89 +/-15%.

Tabla 4B. Composición ilustrativa que comprende los aminoácidos (por ejemplo, un Resto Activo).

Aminoácido	Saquito tubular (g) (3 saquitos tubulares BID)	Dosis (g)	Diaria total	Proporción en peso	% en peso
L-leucina	1.0	3	6	3	11.41
L-arginina	2.0	6	12	6	22.81
L-glutamina	1.67	5	10	5	19.01

N-acetilcisteína	0.43	1.3	2.6	1.3	4.94
L-carnitina	0.333	1	2	1	3.80
L-serina	0.83	2.5	5	2.5	9.51
L-valina	0.333	1	2	1	3.80
L-histidina	0.333	1	2	1	3.80
L-lisina	0.5	1.5	3	1.5	5.70
L-citrulina	1.33	4	8	4	15.21
Aminoácidos totales	8.76	26.3	52.6		100%

Una composición ilustrativa (por ejemplo, un Resto Activo) puede incluir 3 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de leucina, 6 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de arginina, 5 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de glutamina, 1.3 g +/- el 20 % de una entidad de NAC, 1 g +/- el 20 % de una entidad de carnitina, 2.5 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de serina, 1 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de valina, 1 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de histidina, 1.5 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de lisina, y 4 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de citrulina (véase, por ejemplo, g/dosis en la Tabla 4B). Una composición ilustrativa (por ejemplo, un Resto Activo) puede incluir 6 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de leucina, 12 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de arginina, 10 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de glutamina, 2.6 g +/- el 20 % de una entidad de NAC, 2 g +/- el 20 % de una entidad de carnitina, 5 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de serina, 2 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de valina, 2 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de histidina, 3 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de lisina, y 8 g +/- el 20 % de una entidad de aminoácido de citrulina (véase, por ejemplo, el diario total en la Tabla 4B).

Una composición ilustrativa puede incluir una proporción en peso (peso) de una entidad de aminoácido de leucina, una entidad de aminoácido de arginina, una entidad de aminoácido de glutamina, una entidad de NAC, una entidad de carnitina, una entidad de aminoácido de serina, una entidad de aminoácido de valina, una entidad de aminoácido de histidina, una entidad de aminoácido de lisina y una entidad de aminoácido de citrulina de 3 +/- el 15 %: 6 +/- 15%: 5 +/-15%: 1.3 +/-15%: 1 +/-15%: 2.5 +/-15%: 1 +/-15%: 1 +/-15%: 1.5 +/-15%: 4 +/-15%.

v. Relaciones de entidades de aminoácidos

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, la entidad de aminoácido de glutamina, la entidad de NAC, la entidad de carnitina, la entidad de aminoácido de serina, la entidad de aminoácido de valina, la entidad de aminoácido de histidina, la entidad de aminoácido de lisina y la entidad de aminoácido de citrulina es al menos el: 70 % en peso, 75 % en peso, 80 % en peso, 85 % en peso, 90 % en peso, 95 % en peso, 97 % en peso, 98 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, la entidad de aminoácido de glutamina, la entidad de aminoácido de serina y la entidad de aminoácido de citrulina es al menos el: 50 % en peso, 55 % en peso, 60 % en peso, 65 % en peso, 70 % en peso, 75 % en peso, 76 % en peso, 77 % en peso o más de los componentes de la entidad

de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, la entidad de aminoácido de glutamina, y la entidad de aminoácido de serina es al menos el: 40 % en peso, 45 % en peso, 50 % en peso, 55 % en peso, 60 % en peso, 61 % en peso, 62 % en peso, 63 % en peso, 65 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, la entidad de aminoácido de glutamina, la entidad de aminoácido de serina, la entidad de aminoácido de citrulina y la entidad de carnitina es al menos el: 50 % en peso, 55 % en peso, 60 % en peso, 65 % en peso, 70 % en peso, 75 % en peso, 80 % en peso, 81 % en peso, 82 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina, el aminoácido citrulina, y la entidad de aminoácido de glutamina es al menos el: 50 % en peso, 55 % en peso, 60 % en peso, 61 % en peso, 62 % en peso, 63 % en peso, 64 % en peso, 65 % en peso, 66 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de

arginina y la entidad de aminoácido de glutamina es al menos el: 30 % en peso, 35 % en peso, 40 % en peso, 45 % en peso, 50 % en peso, 51 % en peso, 52 % en peso, 53 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina es mayor que, por ejemplo, al menos el: 50 % en peso, 55 % en peso, 60 % en peso, 65 % en peso, 70 % en peso, 71 % en peso, 72 % en peso, 73 % en peso, 74 % en peso, 75 % en peso o más, mayor que el % en peso de una, dos, tres, cuatro o cinco de la entidad de NAC, la entidad de carnitina, la entidad de aminoácido de valina, la entidad de aminoácido de histidina o la entidad de aminoácido de lisina en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de arginina o la entidad de aminoácido de glutamina, de manera única con en combinación, es mayor que, por ejemplo, al menos el: 50 % en peso, 55 % en peso, 60 % en peso, 65 % en peso, 70 % en peso, 75 % en peso, 80 % en peso, 85 % en peso, 90 % en peso, 95 % en peso o más, mayor que el % en peso de una, dos, tres, cuatro, cinco o seis de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de NAC, la entidad de carnitina, la entidad de aminoácido de valina, la entidad de aminoácido de histidina o la entidad de aminoácido de lisina en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de NAC es mayor que, por ejemplo, al menos el: 5 % en peso, 10 % en peso, 15 % en peso, 20 % en peso, 25 % en peso, 25 % en peso, 28 % en peso, 29 % en peso, 30 % en peso o más,

mayor que el % en peso de la entidad de carnitina en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de carnitina es mayor que, por ejemplo, al menos el: 2 % en peso, 3 % en peso, 4 % en peso, 5 % en peso, 6 % en peso, 7 % en peso, 8 % en peso, 9 % en peso, 10 % en peso, 11 % en peso o más, mayor que el % en peso de la entidad de NAC en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso del aminoácido de citrulina o el aminoácido serina, de manera única o en combinación, es mayor que, por ejemplo, al menos el: 5 % en peso, 10 % en peso, 15 % en peso, 16 % en peso, 17 % en peso, 18 % en peso, 19 % en peso, 20 % en peso, 21 % en peso, 22 % en peso o más, mayor que el % en peso de una, dos, tres, cuatro, cinco o seis de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de NAC, la entidad de carnitina, la entidad de aminoácido de valina, la entidad de aminoácido de histidina o la entidad de aminoácido de lisina en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de valina, la entidad de aminoácido de histidina y la entidad de aminoácido de lisina en combinación es mayor que, por ejemplo, al menos el: 20 % en peso, 25 % en peso, 30 % en peso, 35 % en peso, 40 % en peso, 45 % en peso, 47 % en peso, 48 % en peso, 50 % en peso o más mayor que el % en peso de una, dos o tres de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de NAC o la entidad de carnitina en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de arginina y la entidad de aminoácido de glutamina en

combinación es mayor que, por ejemplo, al menos el: 30 % en peso, 35 % en peso, 40 % en peso, 45 % en peso, 50 % en peso, 55 % en peso, 60 % en peso, 65 % en peso o más mayor que el % en peso de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o
5 siete de la entidad de NAC, la entidad de carnitina, la entidad de aminoácido de serina, la entidad de aminoácido de valina, la entidad de aminoácido de histidina, la entidad de aminoácido de lisina o la entidad de aminoácido de citrulina.

10 En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de arginina y la entidad de aminoácido de citrulina en combinación es mayor que, por ejemplo, al menos el: 5 % en peso, 10 % en peso, 15 % en peso, 20 % en peso, 25 % en peso, 25 % en peso, 28 % en peso, 29 % en
15 peso, 30 % en peso o más, mayor que el % en peso de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho de la entidad de aminoácido de leucina, la entidad de aminoácido de glutamina, la entidad de NAC, la entidad de carnitina, la entidad de aminoácido de serina, la entidad de aminoácido
20 de valina o la entidad de aminoácido de histidina o la entidad de aminoácido de lisina.

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina es al menos el: 3 % en peso, 4 % en peso, 5 % en peso, 6 % en peso, 7 % en peso, 8 % en peso
25 o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 40 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en
30 forma seca). En ciertas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina es al menos el 9 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los

componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de arginina es al menos el: 5 % en peso, 10 % en peso, 11 % en peso, 12 % en peso, 13 % en peso, 14 % en peso, 15 % en peso, 16 % en peso, 17 % en peso, 18 % en peso, 19 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 60 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca). En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de arginina es al menos el 20 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de glutamina es al menos el: 5 % en peso, 10 % en peso, 15 % en peso, 20 % en peso, 21 % en peso, 22 % en peso, 23 % en peso, 24 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 60 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de NAC es al menos el: 1 % en peso, 2 % en peso, 3 % en peso, 4 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 30 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los

componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de carnitina es al menos el: 1 % en peso, 2 % en peso, 3 % en peso, 4 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 30 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de serina es al menos el: 5 % en peso, 6 % en peso, 7 % en peso, 8 % en peso, 9 % en peso, 10 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 50 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca). En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de serina es al menos el 11 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de valina es al menos el: 1 % en peso, 2 % en peso, 3 % en peso, 4 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 35 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de histidina es al menos el: 1 % en peso, 2 % en peso, 3 % en peso, 4 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 35 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de lisina es al menos el: 1 % en peso, 2 % en peso, 3 % en peso, 4 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 35 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de citrulina es al menos el: 5 % en peso, 10 % en peso, 11 % en peso, 12 % en peso, 13 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 60 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de leucina es al menos el: 5 % en peso, 6 % en peso, 7 % en peso, 8 % en peso, 9 % en peso, 10 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 40 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los

componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de arginina es al menos el: 10 % en peso, 11 % en peso, 12 % en peso, 13 % en peso, 14 % en peso, 15 % en peso, 16 % en peso, 17 % en peso, 18 % en peso, 19 % en peso, 20 % en peso, 21 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 60 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de glutamina es al menos el: 5 % en peso, 10 % en peso, 15 % en peso, 16 % en peso, 17 % en peso, 18 % en peso, 19 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 50 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de lisina es al menos el: 1 % en peso, 2 % en peso, 3 % en peso, 4 % en peso, 5 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del 35 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

En algunas realizaciones, el % en peso de la entidad de aminoácido de citrulina es al menos el: 5 % en peso, 10

% en peso, 11 % en peso, 12 % en peso, 13 % en peso, 14 % en peso, 15 % en peso o más de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca), pero no más del
5 60 % en peso de los componentes de la entidad de aminoácido o de los componentes totales en la composición (por ejemplo, en forma seca).

Usos, por ejemplo, métodos de tratamiento

10 La divulgación proporciona un método de mejora de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (por ejemplo, todas) de la función, el recambio o la síntesis de eritrocitos; la función, el recambio o la síntesis de hemoglobina; la función vascular; el estrés oxidativo (por
15 ejemplo, uno o ambos de estrés oxidativo en sangre y sistémico); o la inflamación, que comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de una composición desvelada en el presente documento (un Resto Activo). La composición se puede administrar de acuerdo con
20 un régimen de dosificación descrito en el presente documento para mejorar una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (por ejemplo, todas) de la función, el recambio o la síntesis de eritrocitos; la función, el recambio o la síntesis de hemoglobina; la función vascular;
25 el estrés oxidativo (por ejemplo, uno o ambos de estrés oxidativo en sangre y sistémico); o la inflamación en un sujeto (por ejemplo, un ser humano).

La divulgación proporciona un método para una o ambas de tratar una hemoglobinopatía o una talasemia, o prevenir
30 uno o más síntomas de una hemoglobinopatía o una talasemia en un sujeto, que comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de una composición desvelada

en el presente documento (por ejemplo, un Resto Activo). La composición se puede administrar de acuerdo con un régimen de dosificación descrito en el presente documento para tratar una hemoglobinopatía o una talasemia y/o prevenir uno o más síntomas de una hemoglobinopatía o una talasemia en un sujeto (por ejemplo, un ser humano).

En algunas realizaciones, el sujeto ha sido diagnosticado con una hemoglobinopatía o una talasemia. En algunas realizaciones, el sujeto no ha sido diagnosticado con una hemoglobinopatía o una talasemia. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano (por ejemplo, un sujeto pediátrico o un sujeto adulto).

En algunas realizaciones, el sujeto es un bebé, un niño, un adolescente o un adulto. En ciertas realizaciones, el sujeto es un adolescente, por ejemplo, el sujeto tiene 12 +/-20% años a 16 +/-20% años de edad. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene un peso corporal de 40 kg +/-20% a 60 kg +/-20%. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene un peso corporal de más de 60 kg +/-20%.

En algunas realizaciones, el sujeto no ha recibido tratamiento previo con la composición descrita en el presente documento (por ejemplo, un sujeto sin exposición previa).

En algunas realizaciones, la composición descrita en el presente documento (un Resto Activo) es para su uso como un medicamento en la mejora de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más (por ejemplo, todas) de la función, el recambio o la síntesis de eritrocitos; la función, el recambio o la síntesis de hemoglobina; o la función vascular en un sujeto (por ejemplo, un sujeto con una hemoglobinopatía o una talasemia). En algunas realizaciones, la composición es para su uso como un

medicamento en el tratamiento (por ejemplo, la reversión, la reducción o la mejora) de una hemoglobinopatía o una talasemia en un sujeto. En algunas realizaciones, la composición es para su uso como un medicamento en la

5 prevención de uno o más síntomas de una hemoglobinopatía o una talasemia en un sujeto.

En algunas realizaciones, la composición descrita en el presente documento (un Resto Activo) es para su uso en la fabricación de un medicamento, suplemento, alimento

10 médico o alimento funcional en la mejora de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más (por ejemplo, todas) de la función, el recambio o la síntesis de eritrocitos; la función, el recambio o la síntesis de hemoglobina; o la función vascular en un sujeto (por ejemplo, un sujeto con

15 una hemoglobinopatía o una talasemia). En algunas realizaciones, la composición (por ejemplo, el Resto Activo) es para su uso en la fabricación de un medicamento, suplemento, alimento médico o alimento funcional para el tratamiento (por ejemplo, la reversión, la reducción o la

20 mejora) de una hemoglobinopatía o una talasemia en un sujeto. En algunas realizaciones, la composición (por ejemplo, el Resto Activo) es para su uso en la fabricación de un medicamento para la prevención de uno o más síntomas de una hemoglobinopatía o una talasemia en un sujeto.

25 En algunas realizaciones, el sujeto está en riesgo de una hemoglobinopatía (por ejemplo, drepanocitosis) o una talasemia. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene una mutación en el gen HBB.

En una realización, la hemoglobinopatía es una β -

30 hemoglobinopatía. En otra realización, la hemoglobinopatía es una α -hemoglobinopatía.

En algunas realizaciones, los sujetos presentan uno o más síntomas asociados con una hemoglobinopatía elegidos de: anemia, hipoxia tisular, disfunción orgánica, crisis vasooclusivas, valores anormales de hematocrito, eritropoyesis ineficaz, recuento anormal de reticulocitos, carga anormal de hierro, presencia de sideroblastos anulares, esplenomegalia, hepatomegalia, alteración del flujo sanguíneo periférico, disnea, aumento de la hemólisis, ictericia, crisis de dolor anémico, síndrome torácico agudo, secuestro esplénico, priapismo, accidente cerebrovascular, síndrome mano-pie, dolor (por ejemplo, angina de pecho) o una combinación de los mismos. La administración de la composición descrita en el presente documento puede ser eficaz para tratar uno o más de los síntomas asociados con una hemoglobinopatía o talasemia.

En algunas realizaciones, la hemoglobinopatía es una drepanocitosis, por ejemplo, una drepanocitosis elegida de anemia de células falciformes (HbSS), enfermedad de hemoglobina SC (HbSC), talasemia falciforme β^+ (HbS/ β^+), talasemia falciforme β^0 (HbS/ β^0), enfermedad de hemoglobina SE, enfermedad de hemoglobina SD o enfermedad de hemoglobina SO. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene anemia de células falciformes pediátrica. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una o más enfermedades o trastornos asociados con una hemoglobinopatía (por ejemplo, una drepanocitosis) seleccionada entre disfunción neurocognitiva, meningitis, accidente cerebrovascular, hiperbilirrubinemia indirecta, hepatopatía falciforme, cálculos biliares, albuminuria, isostenuria, lesión renal sustancial, necrosis papilar, pubertad tardía, disfunción eréctil, priapismo, necrosis avascular, infarto de médula ósea, osteomielitis, retinopatía, glaucoma posthifema,

infarto de retina, hipertensión pulmonar, síndrome de dolor torácico agudo, episodio de dolor agudo, cardiomegalia, insuficiencia cardíaca diastólica, anemia, leucocitosis, septicemia, asplenia funcional, infarto esplénico, 5 secuestro esplénico, complicaciones del embarazo, úlceras cutáneas o dolor crónico. La administración de la composición descrita en el presente documento puede ser eficaz para tratar uno o más de las enfermedades o los trastornos asociados con una hemoglobinopatía (por ejemplo, 10 una drepanocitosis).

En algunas realizaciones, los sujetos presentan uno o más síntomas asociados con una drepanocitosis seleccionada de: hemólisis, ictericia, colelitiasis, crisis aplásica, crisis hemolítica, enfermedad vasooclusiva que causa 15 dactilitis, autosplenectomía, síndrome torácico agudo, priapismo, accidente cerebrovascular, necrosis papilar renal, crisis de infarto, crisis de secuestro, úlceras en las piernas o una combinación de las mismas. La administración de la composición descrita en el presente documento puede ser eficaz para tratar uno o más de los 20 síntomas asociados con una drepanocitosis.

En algunas realizaciones, la talasemia es α -talasemia, β -talasemia, una enfermedad de hemoglobina CC o enfermedad de hemoglobina EE. En ciertas realizaciones, la β -talasemia 25 se elige de: β -talasemia menor/característica (β/β^0 o β/β^+), β -talasemia intermedia (β^0/β^+) y β -talasemia mayor (β^0/β^0 o β^+/ β^+).

En algunas realizaciones, los sujetos presentan uno o más síntomas asociados con la β -talasemia seleccionados de: 30 hemólisis, anemia, esplenomegalia, eritropoyesis ineficaz, hepatoesplenomegalia, ácido úrico alto en sangre o suero, úlceras en las piernas, infección o una combinación de los

mismos. La administración de la composición descrita en el presente documento puede ser eficaz para tratar uno o más de los síntomas asociados con β -talasemia.

5 **Regímenes de dosificación**

La composición (por ejemplo, el Resto Activo) se puede administrar de acuerdo con un régimen de dosificación descrito en el presente documento para mejorar la función, el recambio y/o la síntesis de eritrocitos y/o de la hemoglobina; la función vascular; la inflamación; y/o el estrés oxidativo en un sujeto, por ejemplo, para reducir o tratar una hemoglobinopatía (por ejemplo, drepanocitosis) o una talasemia. Por ejemplo, la composición se puede administrar al sujeto durante un período de tratamiento de, por ejemplo, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas, seis semanas, siete semanas, ocho semanas, nueve semanas, 10 semanas, 11 semanas, 12 semanas, 13 semanas, 14 semanas, 15 semanas, 16 semanas o más, a una dosis de 2 g $\pm$ 20% g al día a 90 g $\pm$ 20% g al día. En ciertas realizaciones, la composición se administra a una dosis de 40 g $\pm$ 20% a 80 g $\pm$ 20% de entidades de aminoácido totales tres veces al día, por ejemplo, 59 g $\pm$ 20% de entidades de aminoácido totales al día.

En ciertas realizaciones, la composición se administra a una dosis de 30 g $\pm$ 20% a 80 g $\pm$ 20% de entidades de aminoácido totales al día, por ejemplo, 65.1 g $\pm$ 20% de entidades de aminoácido totales al día a un sujeto (por ejemplo, a un sujeto adulto). En ciertas realizaciones, la composición se administra a una dosis de 15 g $\pm$ 20% a 60 g $\pm$ 20% de entidades de aminoácido totales dos veces al día, por ejemplo, 32.55 g $\pm$ 20% de entidades de aminoácido

totales dos veces al día a un sujeto (por ejemplo, a un sujeto adulto).

En ciertas realizaciones, la composición se administra a una dosis de 20 g+/- 20% a 60 g+/- 20% de entidades de aminoácido totales al día, por ejemplo, 40.2 g+/- 20% de entidades de aminoácido totales al día a un sujeto (por ejemplo, a un sujeto pediátrico). En ciertas realizaciones, la composición se administra a una dosis de 10 g+/- 20% a 30 g+/- 20% de entidades de aminoácido totales dos veces al día, por ejemplo, 20.1 g+/- 20% de entidades de aminoácido totales dos veces al día a un sujeto (por ejemplo, a un sujeto pediátrico).

En algunas realizaciones, la composición se puede proporcionar a un sujeto con una hemoglobinopatía (por ejemplo, drepanocitosis) bien como un régimen de dosificación único o múltiple. En algunas realizaciones, se administra una dosis dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, cinco veces al día, seis veces al día, siete veces al día o más. En ciertas realizaciones, la composición se administra una, dos o tres veces al día. En algunas realizaciones, la composición se administra durante al menos 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o 2 semanas. En algunas realizaciones, la composición se administra crónicamente (por ejemplo, más de 30 días, por ejemplo, 31 días, 40 días, 50 días, 60 días, 3 meses, 6 meses, 9 meses, un año, dos años o tres años).

En algunas realizaciones, la composición se administra antes de una comida (por ejemplo, el desayuno, la comida o la cena). En otras realizaciones, la composición se administra a la vez que una comida (por ejemplo, el desayuno, la comida o la cena). En otras realizaciones, la composición se administra después de una comida (por

ejemplo, el desayuno, la comida o la cena). En ciertas realizaciones, la composición se administra con el desayuno y la cena.

La composición se puede administrar cada 2 horas, cada 3 horas, cada 4 horas, cada 5 horas, cada 6 horas, cada 7 horas, cada 8 horas, cada 9 horas, cada 10 horas, cada 11 horas o cada 12 horas para mejorar la función de los eritrocitos en un sujeto (por ejemplo, un sujeto que tiene una hemoglobinopatía, por ejemplo, una drepanocitosis).

En algunas realizaciones, la composición comprende tres saquitos tubulares, por ejemplo, comprendiendo cada saquito tubular el 33.3 % +/- el 15 % de la cantidad de cada entidad de aminoácido incluida en la composición descrita en el presente documento. En ciertas realizaciones, los tres saquitos tubulares se administran dos veces al día.

En algunas realizaciones, la composición comprende cinco saquitos tubulares, por ejemplo, comprendiendo cada saquito tubular el 20% +/- el 15 % de la cantidad de cada entidad de aminoácido incluida en la composición descrita en el presente documento. En ciertas realizaciones, los cinco saquitos tubulares se administran dos veces al día.

En algunas realizaciones, la composición comprende cuatro saquitos tubulares, por ejemplo, comprendiendo cada saquito tubular el 25% +/- el 15 % de la cantidad de cada entidad de aminoácido incluida en la composición descrita en el presente documento. En ciertas realizaciones, los cuatro saquitos tubulares se administran dos veces al día.

En ciertas realizaciones, la composición se administra a una dosis de aproximadamente 2 g +/- 20% a 80 g +/- 20% del total de entidades de aminoácido, por ejemplo, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces

al día, cinco veces al día o seis veces al día (por ejemplo, dos veces al día). En algunas realizaciones, la composición se administra a una dosis de 2 g +/- 20% a 10 g +/- 20%, 20 g +/- 20% a 50 g +/- 20%, o 50 g +/- 20% a 80 g +/- 20% del total de entidades de aminoácido, por ejemplo, una vez al día, dos veces al día o tres veces al día (por ejemplo, dos veces por día). En ciertas realizaciones, la composición se administra a una dosis de 20 g +/- 20% a 50 g +/- 20% de entidades de aminoácido totales dos veces al día, por ejemplo, 29 g +/- 20% de entidades de aminoácido totales dos veces al día. En ciertas realizaciones, la composición se administra a una dosis de aproximadamente 2 g +/- 20% a 80 g +/- 20% del total de entidades de aminoácido, por ejemplo, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, cinco veces al día o seis veces al día (por ejemplo, dos veces al día). En algunas realizaciones, la composición se administra a una dosis de 10 g +/- 20% a 30 g +/- 20%, 20 g +/- 20% a 60 g +/- 20%, o 40 g +/- 20% a 80 g +/- 20% del total de entidades de aminoácido, por ejemplo, una vez al día, dos veces al día o tres veces al día (por ejemplo, dos veces por día). En ciertas realizaciones, la composición se administra a una dosis de 20 g +/- 20% a 60 g +/- 20% de entidades de aminoácido totales dos veces al día, por ejemplo, 32.55 g +/- 20% de entidades de aminoácido totales dos veces al día a un sujeto (por ejemplo, a un sujeto adulto). En ciertas realizaciones, la composición se administra a una dosis de 10 g +/- 20% a 30 g +/- 20% de entidades de aminoácido totales dos veces al día, por ejemplo, 20.1 g +/- 20% de entidades de aminoácido totales dos veces al día a un sujeto (por ejemplo, a un sujeto pediátrico).

En algunas realizaciones, la composición está presente en una forma de dosificación unitaria que comprende 2 g +/- 20% a 15 g +/- 20% de entidades de aminoácido (por ejemplo, 2 g +/- 20%, 3 g +/- 20%, 4 g +/- 20%, 5 g +/- 20%, 6 g +/- 20%, 7 g +/- 20%, 8 g +/- 20%, 9 g +/- 20%, 10 g +/- 20%, 11 g +/- 20%, 12 g +/- 20%, 13 g +/- 20%, 14 g +/- 20%, o 15 g +/- 20% de entidades de aminoácido). En ciertas realizaciones, la composición está presente en una forma de dosificación unitaria que comprende 6.51 g +/- 20% de entidades de aminoácido. En ciertas realizaciones, la composición está presente en una forma de dosificación unitaria que comprende 8.14 g +/- 20% de entidades de aminoácido. En ciertas realizaciones, la composición está presente en una forma de dosificación unitaria que comprende 10.85 g +/- 20% de entidades de aminoácido. En ciertas realizaciones, la composición está presente en una forma de dosificación unitaria que comprende 4.02 g +/- 20% de entidades de aminoácido. En ciertas realizaciones, la composición está presente en una forma de dosificación unitaria que comprende 5.03 g +/- 20% de entidades de aminoácido. En ciertas realizaciones, la composición está presente en una forma de dosificación unitaria que comprende 6.7 g +/- 20% de entidades de aminoácido.

Producción del Resto Activo y composiciones farmacéuticas

La presente divulgación presenta un método de fabricación o de preparación de una composición (por ejemplo, un Resto Activo) de la invención anterior. Las entidades de aminoácido usadas para preparar las composiciones se pueden aglomerar y/o instantizar para ayudar a la dispersión y/o a la solubilización.

Las composiciones se pueden preparar usando entidades de las siguientes fuentes o se pueden usar otras fuentes, por ejemplo, la mezcla instantizada FUSI-BCAA™ (L-Leucina, L-Isoleucina y L-Valina en una proporción de peso de 5 2:1:1), la L-Leucina instantizada y otros ácidos se pueden obtener de Ajinomoto Co., Inc. Las materias primas de entidades de aminoácido de grado farmacéutico se pueden usar en la fabricación de productos de entidad de aminoácido farmacéuticos. Las materias primas de entidades 10 de aminoácidos de grado alimenticio (o suplemento) se pueden usar en la fabricación de productos de entidad de aminoácido dietéticos.

Para producir las composiciones de la presente divulgación, se pueden usar las siguientes etapas 15 generales: los materiales de partida (entidades de aminoácido individuales y excipientes) se pueden mezclar en una unidad de mezclado, seguido por la verificación de la uniformidad de la mezcla y el contenido de la entidad de aminoácido, y rellenando de polvo mezclado los saquitos 20 tubulares u otra forma de dosificación unitaria. El contenido de los saquitos tubulares u otra forma de dosificación unitaria se puede dispersar en agua en el momento de su uso para la administración oral.

Las composiciones de suplemento alimenticio o de 25 nutrición médica de la invención estarán en una forma adecuada para la administración oral.

Cuando se combinan las materias primas, por ejemplo, las entidades de aminoácido de grado farmacéutico y/o los excipientes, en una composición, los contaminantes pueden 30 estar presentes en la composición. Una composición cumple un estándar para un nivel de contaminación cuando la composición no comprende sustancialmente (por ejemplo,

comprende menos del 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.15, 0.1, 0.05, 0.01 o 0.001 % (p/p)) de un contaminante. En algunas realizaciones, una composición descrita en un método en el presente documento no comprende un

5 contaminante. Los contaminantes incluyen cualquier sustancia que no está deliberadamente presente en la composición (por ejemplo, entidades de aminoácido de grado farmacéutico y excipientes, por ejemplo, componentes de administración oral, pueden estar deliberadamente

10 presentes) o cualquier sustancia que tenga un efecto negativo sobre un parámetro de calidad del producto de la composición (por ejemplo, efectos secundarios en un sujeto, potencia reducida, estabilidad/vida útil reducida, decoloración, olor, mal sabor, mala textura/sensación al

15 paladar, aumento de segregación de los componentes de la composición). En algunas realizaciones, los contaminantes incluyen microbios, endotoxinas, metales o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el nivel de contaminación, por ejemplo, por metales, lecitina, colina,

20 endotoxina, microbios u otros contaminantes (por ejemplo, contaminantes de materias primas) de cada una de las porciones de una composición está por debajo del nivel permitido en los alimentos.

25 **Excipientes**

Las composiciones de aminoácidos de la presente divulgación pueden estar compuestas o formuladas con uno o más excipientes. Los ejemplos no limitantes de excipientes adecuados incluyen un saborizante, un aromatizante, un

30 agente tamponador, un conservante, un estabilizante, un aglutinante, un agente de compactación, un lubricante, un potenciador de la dispersión, un agente de desintegración,

un agente aromatizante, un edulcorante y un agente colorante.

En algunas realizaciones, el excipiente comprende un agente tamponador. Los ejemplos no limitantes de agentes
5 tamponadores adecuados incluyen ácido cítrico, citrato de sodio, carbonato de magnesio, bicarbonato de magnesio, carbonato de calcio y bicarbonato de calcio.

En algunas realizaciones, el excipiente comprende un conservante. Los ejemplos no limitantes de conservantes
10 adecuados incluyen antioxidantes, tales como alfa-tocoferol y ascorbato, y antimicrobianos, tales como parabenos, clorobutanol y fenol.

En algunas realizaciones, la composición comprende un aglutinante como un excipiente. Los ejemplos no limitantes
15 de aglutinantes adecuados incluyen almidones, almidones pregelatinizados, gelatina, polivinilpirrolidona, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa, poliacrilamidas, poliviniloxazolidona, alcoholes de polivinilo, alcohol de ácido graso de C12-C18,
20 polietilenglicol, polioles, sacáridos, oligosacáridos y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la composición comprende un lubricante como un excipiente. Los ejemplos no limitantes de lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio,
25 estearato de calcio, estearato de zinc, aceites vegetales hidrogenados, sterotex, monoestearato de polioxietileno, talco, polietilenglicol, benzoato de sodio, laurilsulfato de sodio, laurilsulfato de magnesio y aceite mineral ligero.

30 En algunas realizaciones, la composición comprende un potenciador de dispersión como un excipiente. Los ejemplos no limitantes de dispersantes adecuados incluyen almidón,

ácido algínico, polivinilpirrolidonas, goma guar, caolín, goma de xantano, bentonita, celulosa de madera purificada, almidón glicolato de sodio, silicato isoamorfo y tensioactivos emulsionantes de alto HLB.

5 En algunas realizaciones, la composición comprende un desintegrante como un excipiente. En algunas realizaciones, el desintegrante es un desintegrante no efervescente. Los ejemplos no limitantes de desintegrantes no efervescentes incluyen almidones tales como almidón de maíz, almidón de
10 patata, almidón pregelatinizado y modificado de los mismos, edulcorantes, arcillas tales como bentonita, celulosa microcristalina, alginatos, almidón glicolato de sodio, gomas tales como agar, guar, algarroba, karaya, pectina y tragacanto. En algunas realizaciones, el desintegrante es
15 un desintegrante efervescente. Los ejemplos no limitantes de desintegrantes efervescentes adecuados incluyen bicarbonato de sodio en combinación con ácido cítrico y bicarbonato de sodio en combinación con ácido tartárico.

 En algunas realizaciones, el excipiente comprende un
20 agente aromatizante. Los agentes aromatizantes se pueden elegir de aceites aromatizantes sintéticos y aromáticos aromatizantes; aceites naturales; extractos de plantas, hojas, flores y frutos; y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agente aromatizante se selecciona
25 de aceites de canela; aceite de gaulteria; aceites de menta; aceite de trébol; aceite de heno; aceite de anís; eucalipto; vainilla; aceite de cítricos como aceite de limón, aceite de naranja, aceite de uva y pomelo; y esencias de frutas que incluyen manzana, melocotón, pera,
30 fresa, frambuesa, cereza, ciruela, piña y albaricoque.

 En algunas realizaciones, el excipiente comprende un edulcorante. Los ejemplos no limitantes de edulcorantes

adecuados incluyen glucosa (jarabe de maíz), dextrosa, azúcar invertido, fructosa y mezclas de los mismos (cuando no se usa como un vehículo); sacarina y sus diversas sales tales como la sal de sodio; edulcorantes dipéptidos tales como aspartamo; compuestos de dihidrocalcona, glicirricina; Stevia rebaudiana (estevisido); derivados de cloro de sacarosa tales como sucralosa; y alcoholes de azúcar tales como sorbitol, manitol, xilitol y similares. También se contemplan hidrolizados de almidón hidrogenado y el edulcorante sintético 3,6-dihidro-6-metil-1,2,3-oxatiazin-4-ona-2,2-dióxido, en particular, la sal de potasio (acesulfamo-K) y sales de sodio y calcio de la misma.

En algunas realizaciones, la composición comprende un agente colorante. Los ejemplos no limitantes de agente de color adecuados incluyen colores de alimentos, fármacos y cosméticos (FD&C), colores de fármacos y cosméticos (D&C) y colores de fármaco externo y cosméticos (Ext. D&C). Los agentes colorantes se pueden usar como tintes o sus correspondientes lacas.

Los excipientes particulares pueden incluir uno o más de ácido cítrico, lecitina (por ejemplo, Alcolac F100), edulcorantes (por ejemplo, sucralosa, sucralosa micronizada NF, acesulfamo potasio (por ejemplo, Ace-K)), un potenciador de la dispersión (por ejemplo, goma de xantano (por ejemplo, Ticaxan Rapid-3)), aromatizantes (por ejemplo, natillas de vainilla n.º 4306, naranja natural WONF n.º 1326, lima 865.0032U y limón 862.2169U), un agente enmascarador del sabor amargo (por ejemplo, 936.2160U), y colorantes naturales o artificiales (por ejemplo, FD&C Amarillo 6). Los contenidos de los ingredientes ilustrativos de cada saquito tubular se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Contenidos de ingredientes en cada saquito tubular.

INGREDIENTE	GRADO	FUNCIÓN	FUENTE; COMENTARIOS
Aminoácidos	USP	Ingrediente farmacéutico activo (API)	Diversas fuentes; Forma no instantizada (escala MFG)
Acido cítrico	USP	pH, Sabor	Spectrum Chems; $f(\text{volumen}) \leq 1.0\%$ p/v
Acesulfamo K	NF	Edulcorante (aparición rápida)	Spectrum Chems; Edulcorante 1 de Target
Sucralosa	NF	Edulcorante (aparición lenta)	Spectrum Chems; WHO ADI ≤ 15 mg/kg
Lecitina (Alecotec F100)	FCC	Agente humectante	American Lecithin Company
Goma de xantano	FCC	Estabilizante/Espesante	TIC Gums; $f(\text{volumen}) \leq 0.5\%$ p/v
Natillas de vainilla (Art)	GRAS	Sabor/Aroma	David Michael; azufre Mask
Naranja (Natural y WONF)	GRAS	1º sabor	David Michael; El perfil de cítricos coincide con el pH bajo
Lima (Natural y WONF)	GRAS	2º sabor	FONA; Proveedor de un solo sabor
Limón (Natural y artificial)	GRAS	2º sabor	FONA; Proveedor de un solo sabor
Modificador del sabor	GRAS	Enmascarador del sabor amargo	FONA; Útil a bajo volumen
FD&C Amarillo N.º 6	USP	Color	Sensient; Coincide con el perfil de sabor

- 5 En otra realización, los excipientes se limitan a ácido cítrico, un edulcorante (por ejemplo, sucralosa), goma de xantano, un agente de aroma)(por ejemplo, natillas de vainilla n.º 4036), un agente aromatizante (por ejemplo, naranja natural WONF n.º 1362) y un agente colorante (por

ejemplo, FD&C Amarillo 6), por ejemplo, el excipiente excluye específicamente la lecitina (Tabla 6).

Tabla 6. Contenidos ilustrativos en cada saquito tubular.

5

INGREDIENTE	GRADO	FUNCIÓN
Aminoácidos	USP	Ingrediente farmacéuticamente activo (API)
Ácido cítrico	USP	pH, Sabor
Sucralosa	NF	Edulcorante (aparición lenta)
Goma de xantano	FCC	Estabilizante/Espesante
Natillas de vainilla (Art)	GRAS	Aroma
Naranja (Nat+WONF)	GRAS	1º sabor
FD&C Amarillo N.º 6	USP	Color

Producción de preparaciones mezcladas en seco

Para producir las preparaciones mezcladas en seco de la presente divulgación, se pueden usar las siguientes etapas generales: las entidades de aminoácido de grado farmacéutico individuales (y, opcionalmente, uno o más excipientes y/o componentes de administración oral) se pueden combinar en una combinación y someterlos a una o más condiciones de mezclado (por ejemplo, mezclado y combinado). En algunas realizaciones, las condiciones de mezclado continúan hasta que la combinación cumple uno o más estándares de referencia. En algunas realizaciones, la PGDBP resultante se divide en una pluralidad de porciones. En algunas realizaciones, al menos un porcentaje de las porciones de la pluralidad de porciones también cumple uno o más estándares de referencia, por ejemplo, los estándares de referencia que cumplen la PGDBP. En algunas realizaciones, al menos un porcentaje de las porciones de la pluralidad de porciones cumple uno o más estándares de referencia.

En algunas realizaciones, la preparación mezclada en seco, por ejemplo, la PGDBP también es una preparación a gran escala. A gran escala, tal como se usa en el presente documento, describe una preparación que es mayor (por
5 ejemplo, en peso, masa o volumen) que un valor de referencia. En algunas realizaciones, el valor de referencia es el tamaño de una preparación experimental típica (por ejemplo, no de fabricación). En algunas realizaciones, el valor de referencia es 10, 11, 12, 13, 14
10 o 15 kg. En algunas realizaciones, las preparaciones a gran escala comprenden al menos 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o 10000 kg. En algunas realizaciones, las preparaciones a
15 gran escala comprenden no más de 10000, 5000, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400 o 300 kg. En algunas realizaciones, una preparación a gran escala comprende 100-500 kg, 100-400 kg, 100-300, 100-200 kg, 200-300 kg, 200-400 kg, 200-500 kg, 300-400 kg, 300-500 kg, 400-500 o 500-1000 kg.

20

Técnicas de mezclado

Los métodos desvelados en el presente documento comprenden etapas de mezclado que mezclan y combinan combinaciones de entidades de aminoácido de grado
25 farmacéutico para crear PGDBP que cumplen un estándar de referencia. Las condiciones de mezcla usadas en los métodos descritos en el presente documento pueden utilizar cualquier mecanismo de mezclado conocido o combinación de mecanismos de mezclado. Los mecanismos de mezclado incluyen
30 convección, difusión y cizallamiento. El mezclado convectivo utiliza un movimiento grueso de partículas, por ejemplo, mediante una rotación suave dentro de un

mezclador/licuadora. La difusión es el mezclado lento y pasivo de partículas. El mezclado por cizallamiento empuja parte de una combinación de partículas en una dirección y otra parte de la combinación de partículas en otra

5 dirección a lo largo del mismo plano paralelo. Las condiciones de mezclado usadas por los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además el uso de granuladores u otro equipo para modificar el tamaño y/o la forma de las partículas de los componentes de combinación

10 (por ejemplo, entidades de aminoácido de grado farmacéutico).

En algunas realizaciones, el mezclado o la condición de mezclado empleada por un método desvelado en el presente documento comprende un mezclado convectivo. En algunas

15 realizaciones, el mezclado o la condición de mezclado empleada por un método desvelado en el presente documento comprende un mezclado por difusión. En algunas realizaciones, el mezclado o la condición de mezclado empleada por un método desvelado en el presente documento

20 comprende un mezclado por cizallamiento. En algunas realizaciones, el mezclado o la condición de mezclado empleada por un método desvelado en el presente documento comprende un mezclado convectivo y por difusión. En algunas realizaciones, el mezclado o la condición de mezclado

25 empleada por un método desvelado en el presente documento comprende un mezclado convectivo y por cizallamiento. En algunas realizaciones, el mezclado o la condición de mezclado empleada por un método desvelado en el presente documento comprende un mezclado por difusión y

30 cizallamiento. En algunas realizaciones, el mezclado o la condición de mezclado empleada por un método desvelado en

el presente documento comprende un mezclado convectivo, por difusión y por cizallamiento.

Las condiciones de mezclado usadas por los métodos descritos en el presente documento pueden utilizar cualquier equipo de mezclado o combinado conocido; el
5 equipo de mezclado o combinado puede funcionar basándose en uno o más mecanismos de mezclado. Hay cuatro tipos principales de equipo de mezclado o combinado: convectivo, tolvas (es decir, gravimétrico), volteadores y
10 fluidización. En algunas realizaciones, una condición de mezclado o etapa de mezclado de un método descrito en el presente documento puede utilizar uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) tipos de equipo de mezclado o combinado. En algunas realizaciones, las preparaciones mezcladas en seco
15 (por ejemplo, las PGDBP) se preparan en lotes. En algunas realizaciones, las preparaciones mezcladas en seco (por ejemplo, las PGDBP) se preparan de forma continua, por ejemplo, recolectando la preparación mezclada/combinada sin interrumpir el mezclado o el combinado.

20 Las etapas de mezclado o combinado de los métodos desvelados en el presente documento son de suficiente duración como para producir una preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP que cumple un estándar de referencia. En algunas realizaciones, la duración de la
25 condición de mezclado es al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 75, 90, 105 o 120 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la condición de mezclado no es más de 180, 165, 150, 135, 120, 105, 90, 75, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25 o 20 minutos. En algunas realizaciones,
30 la duración de la condición de mezclado es 20-90, 20-60, 20-50, 20-40, 20-30, 30-90, 30-60, 30-50, 30-40, 40-90, 40-60, 40-50, 50-90, 50-60 o 60-90 minutos. En algunas

realizaciones, la duración de la condición de mezclado es 20-40 minutos, por ejemplo, 20 minutos, 30 minutos o 40 minutos. En algunas realizaciones, la duración de la condición de mezclado es suficiente como para que el
5 mezclado y el combinado no introduzca heterogeneidad en la combinación o preparación mezclada en seco, por ejemplo, por sobremezclado. En algunas realizaciones, la duración de la condición de mezclado se determina mediante la evaluación de si se ha cumplido un estándar de referencia.
10 Por ejemplo, la condición de mezclado puede continuar hasta que una evaluación muestre que se ha cumplido el estándar de referencia. En algunas realizaciones en donde el estándar de referencia es la uniformidad de la composición, por ejemplo, uniformidad de la mezcla, la evaluación de si
15 se ha cumplido un estándar de referencia comprende usar espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés). En una realización, la condición de mezclado se mantiene hasta que el espectro NIR observado muestra que un estándar para la uniformidad de la composición, por
20 ejemplo, la uniformidad de la mezcla, se ha cumplido.

En algunas realizaciones, los métodos desvelados en el presente documento comprenden las etapas que mezclan y combinan combinaciones de entidades de grado farmacéutico para crear las PGDBP, en donde las etapas de mezclado
25 tienen lugar a temperatura ambiente, por ejemplo, entre 15 y 35°C, por ejemplo, entre 20 y 30°C, por ejemplo, en aproximadamente 25°C. En algunas realizaciones, las etapas de mezclado tienen lugar a una temperatura menor de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36,
30 37, 38, 39, o 40°C (y opcionalmente a una temperatura de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25°C). En algunas realizaciones,

las etapas de mezclado tienen lugar a una temperatura de aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30°C.

En algunas realizaciones, los métodos desvelados en el presente documento comprenden etapas de mezclado que mezclan y combinan combinaciones de entidades de aminoácidos de grado farmacéutico para crear PGDBP, en donde las etapas de mezclado comprenden el uso de una velocidad de rotación del mezclador o de la licuadora (por ejemplo, una velocidad rotacional del rotor del mezclador o de la licuadora) de menos de 10,000, 9,000, 8,000, 7,000, 6,000, 5,000, 4,000, 3,000, 2,000, 1,000, 500, 250, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10 rotaciones por minuto (rpm) (y opcionalmente, al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 rpm). En algunas realizaciones, las etapas de mezclado comprenden el uso de una velocidad de rotación del mezclador o de la licuadora (por ejemplo, una velocidad rotacional del rotor del mezclador o de la licuadora) de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 rpm. En algunas realizaciones, las etapas de mezclado comprenden el uso de una velocidad de rotación del mezclador o de la licuadora (por ejemplo, una velocidad rotacional del rotor del mezclador o de la licuadora) de entre 5-50, 5-45, 5-40, 5-35, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-50, 10-45, 10-40, 10-35, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-50, 15-45, 15-40, 15-35, 15-30, 15-25, 15-20, 20-50, 20-45, 20-40, 20-35, 20-30, 20-25, 25-50, 25-45, 25-40, 25-35, 25-30, 30-50, 30-45, 30-40, 30-35, 35-50, 35-45, 35-40, 40-50, 40-45 o 45-50 rpm.

En algunas realizaciones, el método comprende además la compactación con rodillo y/o la granulación húmeda. En algunas realizaciones, el método comprende además el

relleno automatizado, por ejemplo, que incorpora el mezclado directo, la compactación con rodillo o la granulación húmeda.

La segregación de diferentes especies de partículas en una combinación (por ejemplo, la preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP) durante el mezclado o el combinado, la división de porciones o el procesamiento aguas abajo es una barrera para cumplir y mantener los estándares de referencia, por ejemplo, un estándar de uniformidad de composición. Cualquier mezcla de dos o más tipos de partículas puede ser vulnerable a la segregación. La segregación puede tener lugar mediante uno o más de varios mecanismos, incluyendo tamizado, fluidización y espolvoreado (por ejemplo, véase Purutyan, H y Carson, J.W. Predicting, diagnosing, and solving mixture segregation problems. Jenike y Johnson, CSC Publishing, Powder and Bulk Engineering, 2013).

Muestreo y medición

Los métodos descritos en el presente documento para fabricar una preparación mezclada en seco, por ejemplo, una PGDBP que cumple un estándar de referencia puede comprender además evaluar si se ha cumplido el estándar de referencia. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden adquirir un valor, por ejemplo, para la cantidad de una entidad de aminoácido de grado farmacéutico, de uno o más puntos de muestre en una preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP. Un punto de muestreo es una localización, por ejemplo, definida espacialmente y temporalmente, dentro de una preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP. En algunas realizaciones, para adquirir un valor, se puede acceder a

un punto de muestreo. Acceder a un punto de muestreo puede comprender usar una técnica de diagnóstico en la preparación mezclada en seco del punto de muestreo. En algunas realizaciones, el acceso, por ejemplo, usando una
5 técnica de diagnóstico, comprende detener o pausar el mezclado o el combinado o la condición de mezclado para acceder al punto de muestreo. En algunas realizaciones, el acceso, por ejemplo, usando una técnica de diagnóstico, no comprende detener o pausar el mezclado o el combinado o la
10 condición de mezclado para acceder al punto de muestreo. Los puntos de muestreo se pueden designar y/o acceder por los métodos conocidos en la materia.

En algunas realizaciones, las muestras adquiridas de un punto de muestreo de una combinación o preparación
15 mezclada en seco (por ejemplo, PGDBP) o porciones de una preparación mezclada en seco (por ejemplo, PGDBP) se pueden analizar usando la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) para adquirir un valor (por ejemplo, para la uniformidad de la composición, por ejemplo, uniformidad de
20 la mezcla). La espectroscopía NIR analiza el espectro de absorción de los compuestos en la región de longitud de onda NIR (780-2500 nm). Los picos de absorción de los compuestos, por ejemplo, las entidades de aminoácidos de grado farmacéutico, se producen por vibraciones moleculares
25 clasificadas en dos tipos: armónicos y combinaciones. Los compuestos que comprenden enlaces CH, OH o NH se pueden analizar usando NIR. Los métodos de interpretación de espectros NIR se conocen en la materia. En algunas realizaciones, la espectroscopía NIR se usa para determinar
30 si las cantidades de entidades de aminoácidos en una pluralidad de puntos de muestreo son similares, por ejemplo, si se ha cumplido un estándar para la homogeneidad

(por ejemplo, uniformidad de composición, por ejemplo, uniformidad de la mezcla). En algunas realizaciones, los métodos comprenden además, en respuesta a la determinación, seleccionar y/o ejecutar una etapa, por ejemplo,

- 5 seleccionar y usar una técnica de combinación o mezclado o condición de combinación o finalizar combinación, mezcla o condición de combinación.

En algunas realizaciones, las muestras adquiridas de un punto de muestreo de una combinación o preparación
10 mezclada en seco (por ejemplo, PGDBP) o porciones de una preparación mezclada en seco (por ejemplo, PGDBP) se pueden analizar usando la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, también citada como la cromatografía líquida de alta presión) para adquirir un valor (por
15 ejemplo, para la cantidad de una entidad de aminoácido de grado farmacéutico).

En algunas realizaciones, las muestras adquiridas de un punto de muestreo de una combinación o preparación mezclada en seco (por ejemplo, PGDBP) o porciones de una
20 preparación mezclada en seco (por ejemplo, PGDBP) se pueden analizar usando la espectrometría de masas con cromatografía líquida (LC-MS). En algunas realizaciones, la LC-MS se usa para determinar la identidad y/o las cantidades de entidades de aminoácido de grado farmacéutico
25 presentes en un punto de muestreo o en una porción. En algunas realizaciones, la LC-MS se usa para determinar si una preparación mezclada en seco cumple un estándar para la uniformidad de la composición, por ejemplo, uniformidad de la porción o de la mezcla. En algunas realizaciones, los
30 métodos comprenden además, en respuesta a la(s) cantidad(es) de entidades de aminoácido de grado farmacéutico presente(s) seleccionar y/o ejecutar una

etapa, por ejemplo, seleccionar y usar una técnica de combinación o mezclado o condición de combinación o finalizar combinación, mezcla o condición de combinación.

5 **Estándares de referencia**

Los métodos descritos en el presente documento producen preparaciones mezcladas en seco, por ejemplo, las PGDBP, que cumplen uno o más estándares de referencia. Un estándar de referencia, tal como se usa en el presente
10 documento, significa: un estándar usado o establecido por:

(1) un fabricante de una combinación (por ejemplo, preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP), por ejemplo, un fabricante que tiene la aprobación de una agencia gubernamental para comercializar la PGDBP, o

15 (2) la industria farmacéutica o las agencias o entidades (por ejemplo, agencias o entidades gubernamentales o comerciales) que regulan la industria farmacéutica,

para asegurar que uno o más parámetros de calidad del
20 producto están dentro de los límites aceptables para un medicamento, composición farmacéutica, tratamiento u otro agente terapéutico. Un parámetro de calidad del producto puede ser cualquier parámetro regulado por el fabricante, la industria farmacéutica o por las agencias o entidades,
25 por ejemplo, agencias o entidades gubernamentales o comerciales, incluyendo pero sin limitación la composición; la uniformidad de la composición; la dosificación; la uniformidad de la dosificación; la presencia, ausencia y/o el nivel de contaminantes o impurezas; y el nivel de
30 esterilidad (por ejemplo, la presencia, ausencia y/o el nivel de microbios). Las agencias reguladoras gubernamentales ilustrativas incluyen: Federal Drug

Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA),
SwissMedic, China Food and Drug Administration (CFDA), o
Japanese Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA),
Health Canada, and Medicines and Healthcare Products
5 Regulatory Agency (MHRA). Un parámetro de calidad del
producto también puede ser un parámetro especificado por
una farmacopea o formulario nacional o regional, incluida
la Farmacopea de los EE.UU. (USP), la Farmacopea británica
(BP), el Formulario nacional (NF), la Farmacopea europea
10 (EP), la Farmacopea japonesa (JP), o el Consejo
Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos
para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH).

Los uno o más estándares de referencia pueden ser un
estándar usado o promulgado por la industria farmacéutica o
15 por agencias o entidades, por ejemplo, agencias o entidades
gubernamentales o comerciales, que regulan la industria
farmacéutica para asegurar que uno o más parámetros de
calidad del producto están dentro de los intervalos
aceptables para un medicamento, composición farmacéutica,
20 tratamiento u otro agente terapéutico. Los uno o más
estándares de referencia pueden ser un estándar usado o
establecido por un fabricante de una combinación (por
ejemplo, preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP),
por ejemplo, un fabricante que tiene la aprobación de una
25 agencia gubernamental para comercializar la PGDBP, para
asegurar que uno o más parámetros de calidad del producto
están dentro de los intervalos aceptables para un
suplemento, nutracéutico, medicamento, composición
farmacéutica, tratamiento u otro agente terapéutico. Un
30 parámetro de calidad del producto puede ser cualquier
parámetro regulado por el fabricante, o por la industria
farmacéutica o por las agencias o entidades, por ejemplo,

agencias o entidades gubernamentales o comerciales, incluyendo pero sin limitación la composición; la uniformidad de la composición; la dosificación; la uniformidad de la dosificación; la presencia, ausencia y/o
5 el nivel de contaminantes o impurezas; el nivel de esterilidad (por ejemplo, la presencia, ausencia y/o el nivel de microbios), color o morfología de la partícula (por ejemplo, tamaño o forma).

10 **Uniformidad de la composición**

En algunas realizaciones, el estándar de referencia es la uniformidad de la composición. La uniformidad de la composición, en general, es un estándar de uniformidad. La uniformidad de la composición se puede clasificar en dos
15 tipos de uniformidad diferentes pero relacionados: la uniformidad de la mezcla y la uniformidad de la porción (la uniformidad de la porción se usa de forma intercambiable con la uniformidad del contenido y la uniformidad de la dosificación en el presente documento). La uniformidad de
20 la composición puede comprender uno o ambos tipos, dependiendo del uso y del contexto. La uniformidad de la composición puede comprender un estándar de la homogeneidad de una combinación (por ejemplo, preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP) en relación con uno o una
25 pluralidad de componentes. En algunas realizaciones, una combinación que cumple un estándar para la uniformidad de la composición lo hace con respecto a uno, dos, tres, cuatro o más (por ejemplo, todos) los componentes (por ejemplo, entidades de aminoácido de grado farmacéutico).

30

Uniformidad de la mezcla

La uniformidad de la mezcla se refiere al nivel de homogeneidad de la distribución de componentes en una combinación, por ejemplo, preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP. En algunas realizaciones, un estándar para la uniformidad de composición, por ejemplo, uniformidad de la mezcla, se cumple cuando la cantidad de un componente (por ejemplo, una entidad de aminoácido de grado farmacéutico) en un primer punto de muestreo en la combinación (por ejemplo, preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP) difiere en no más de una cantidad predeterminada de un valor de referencia. Las cantidades pueden ser absolutas, por ejemplo, gramos, o relativas, por ejemplo, peso/peso (por ejemplo, X g del componente en Y g de punto de muestreo). Las cantidades pueden ser valores arbitrarios, como en el caso de comparar valores de absorbancia con valores de absorbancia o en comparaciones estadísticas de curvas, por ejemplo, de espectros. En algunas realizaciones, adquirir un valor para la uniformidad de la mezcla comprende evaluar un estándar para la uniformidad de la composición, por ejemplo, uniformidad de la mezcla, adquiriendo un valor para la cantidad de un componente en un primer punto de muestreo en la combinación y compararlo con el valor de referencia.

En algunas realizaciones, la NIR se usa para determinar si la cantidad de un componente (por ejemplo, una entidad de aminoácido de grado farmacéutico) en un primer punto de muestreo en la combinación (por ejemplo, preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP) difiere en no más de una cantidad predeterminada de un segundo o más muestreos. Al usar la NIR, se puede adquirir el espectro infrarrojo cercano para un punto de muestreo y

compararlo con el espectro infrarrojo cercano para un segundo o más muestreos (por ejemplo, un tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y/o décimo punto de muestreo) o con el espectro infrarrojo cercano para una muestra conocida que cumple un estándar de referencia, por ejemplo, un estándar para la uniformidad de la composición, por ejemplo, uniformidad de la mezcla. Si la comparación muestra que los espectros son lo suficientemente similares entre sí, se cumple un estándar para la uniformidad de la mezcla. La similitud de los espectros de NIR se pueden evaluar mediante la comparación del índice de conformidad de los puntos de muestreo. El índice de conformidad es un valor generado por los espectros de NIR obtenidos, y los ejemplos de índices de conformidad descritos no son un listado exhaustivo de todos los posibles índices de conformidad. El índice de conformidad puede ser la absorbancia a una longitud de onda o longitudes de onda particulares en el intervalo del infrarrojo cercano. El índice de conformidad puede ser la desviación estándar de la absorbancia a una longitud de onda o longitudes de onda particulares en el intervalo del infrarrojo cercano a una pluralidad de puntos de muestreo. La característica clave del índice de conformidad, cualquiera que sea el valor seleccionado, es que los índices de conformidad de los puntos de muestreo a los que se accede convergen (en el caso de absorbancia a una longitud de onda particular) o se reducen (en el caso de desviación estándar) a medida que aumenta el tiempo de mezcla/combinado. Por ejemplo, el índice de conformidad se puede seleccionar para que sea una longitud de onda de X nm en el intervalo del infrarrojo cercano. La absorbancia a X nm se medirá a una pluralidad de puntos de muestreo en puntos temporales durante el

mezclado. A medida que continúa la mezcla, la absorbancia a X nm en cada punto de muestreo se volverá más similar entre sí.

En algunas realizaciones, el valor de referencia es la cantidad del componente en un segundo o más punto de muestreo (por ejemplo, un tercer, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y/o décimo punto de muestreo) punto de muestreo en la combinación (por ejemplo, preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP). El segundo punto de muestreo o punto de muestreo adicional (por ejemplo, un tercer, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y/o décimo punto de muestreo) puede ser una ubicación espacial diferente en la combinación, por ejemplo, las muestras se pueden recolectar de un conjunto de ubicaciones espaciales dispersas y predeterminadas, por ejemplo, un plan de muestreo estratificado con sitios predeterminados para muestrear, por ejemplo, para obtener muestras que representan una variedad de ubicaciones en el mezclador o mezclador.

En algunas realizaciones, el segundo punto de muestreo es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más minutos después del primer punto de muestreo. En algunas realizaciones, los múltiples puntos de muestreo separados en el tiempo se toman a lo largo del proceso de fabricación de la preparación mezclada en seco (por ejemplo, PGDBP). En algunas realizaciones, los puntos de muestreo separados en el tiempo están en intervalos a lo largo del proceso de fabricación de la preparación mezclada en seco (por ejemplo, PGDBP), por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 minutos. En algunas realizaciones, los múltiples puntos de muestreo se comparan entre sí (por ejemplo, los puntos de muestreo más recientes se comparan entre sí).

En algunas realizaciones, se cumple un estándar para la uniformidad de la composición, por ejemplo, uniformidad de la mezcla, cuando la cantidad del componente en un primer punto de muestreo difiere del valor de referencia, por ejemplo, la cantidad del componente en un segundo o más puntos de muestreo (por ejemplo, un tercer, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y/o décimo punto de muestreo) en menos de o igual al 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o el 10 %, por ejemplo, el 10 %. En algunas realizaciones, se cumple un estándar para la uniformidad de la composición cuando la cantidad de un componente en un primer muestreo difiere en no más del 10 % de la cantidad del componente en un segundo o más punto de muestreo (por ejemplo, un tercer, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y/o décimo punto de muestreo). En algunas realizaciones, se cumple un estándar para la uniformidad de la composición cuando la cantidad de un componente en un primer muestreo difiere en no más del 10 % de la cantidad del componente presente en la combinación (por ejemplo, preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP). En algunas realizaciones, se cumple un estándar para la uniformidad de la composición cuando la cantidad de un componente en el punto de muestreo más reciente difiere en no más del 10 % de la cantidad del componente presente en el siguiente punto de muestreo más reciente. Los valores para la cantidad de un componente presente en un punto de muestreo pueden comprender espectros de NIR. Las comparaciones de los valores para la cantidad de un componente presente en un primer, segundo o más puntos de muestreo pueden comprender la comparación de espectros de NIR, por ejemplo, espectros de NIR que se solapan o la comparación de índices de conformidad del primer, segundo o más puntos de muestreo. La uniformidad de

la mezcla se puede cumplir cuando los espectros de NIR, por ejemplo, los índices de conformidad, alcanzan un umbral de similitud o se solapan.

5 Uniformidad de porción

La uniformidad de porción se refiere a la homogeneidad de porciones de la preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP, con respecto a las cantidades de componentes (por ejemplo, entidades de aminoácido de grado farmacéutico). En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden la división de una preparación mezclada en seco (por ejemplo, PGDBP) en una pluralidad de porciones. En algunas realizaciones, un estándar para la uniformidad de composición, por ejemplo, uniformidad de porción, se cumple cuando la cantidad de un componente (por ejemplo, una entidad de aminoácido de grado farmacéutico) en una primera porción difiere en no más de una cantidad predeterminada de un valor de referencia. Las cantidades pueden ser absolutas, por ejemplo, gramos, o relativas, por ejemplo, peso/peso (por ejemplo, X g del componente en Y g de punto de muestreo). En algunas realizaciones, la cantidad de un componente (por ejemplo, una entidad de aminoácido de grado farmacéutico) en una primera, segunda o más porciones (por ejemplo, una tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena o décima porción) se determina usando la HPLC.

En algunas realizaciones, el valor de referencia es la cantidad del componente en una segunda porción. En algunas realizaciones, el valor de referencia es la cantidad (o las cantidades) del componente en una pluralidad de porciones, por ejemplo, una pluralidad de porciones de prueba (por ejemplo, la primera porción se compara con una pluralidad

de porciones de prueba). En una realización, el valor de referencia es el promedio o la mediana de la cantidad del componente en la pluralidad de porciones de prueba.

En algunas realizaciones, un estándar para la
5 uniformidad de composición, por ejemplo, uniformidad de porción, se cumple cuando las cantidades de un componente (por ejemplo, una entidad de aminoácido de grado farmacéutico) en una pluralidad de porciones de prueba difiere en no más de una cantidad predeterminada de un
10 valor de referencia. Las cantidades pueden ser absolutas, por ejemplo, gramos, o relativas, por ejemplo, peso/peso (por ejemplo, X g del componente en Y g de punto de muestreo). En algunas realizaciones, el valor de referencia es el promedio o la mediana de la cantidad del componente
15 en la pluralidad de porciones de prueba.

En algunas realizaciones, el valor de referencia es la cantidad del componente en la combinación (por ejemplo, la preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP). Por ejemplo, el valor de referencia puede ser el peso
20 total/peso del componente presente en la combinación total. En algunas realizaciones, la evaluación de si se cumple un estándar para la uniformidad de la composición comprende comparar una cantidad relativa de un componente en un primer punto de muestreo (por ejemplo, X g del componente
25 en Y g de punto de muestreo) con la cantidad relativa del componente en la combinación (por ejemplo, W g del componente en Z g de la combinación total); en otras palabras, evaluar el estándar para la uniformidad de la composición puede comprender comparar X/Y con W/Z .

30 En una realización, al menos el X % de las porciones de la pluralidad de porciones de la preparación mezclada en seco (por ejemplo, PGDBP) son porciones de prueba en donde

X es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50. En algunas realizaciones, no más del X % de las porciones de la pluralidad de porciones de la preparación mezclada en seco (por ejemplo, PGDBP) son porciones de prueba en donde X es 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1. En una realización, las porciones de prueba son porciones comparadas con un valor de referencia, por ejemplo, entre sí o la cantidad de un componente presente en la preparación mezclada en seco (por ejemplo, PGDBP) para determinar si se ha cumplido un estándar de referencia (por ejemplo, para la uniformidad de la composición, por ejemplo, uniformidad de la porción). En algunas realizaciones, se cumple un estándar para la uniformidad de la composición, por ejemplo, la uniformidad de la porción, cuando la cantidad de un componente presente en al menos el X % de las porciones de prueba difiere de un valor de referencia en no más del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o del 10 % en donde X es el 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 99 o el 100 %, y en donde el valor de referencia se selecciona de la cantidad promedio del componente presente en las porciones de prueba, la cantidad mediana del componente presente en las porciones de prueba o la cantidad del componente presente en la preparación mezclada en seco (por ejemplo, PGDBP).

En algunas realizaciones, las porciones de la preparación mezclada en seco (por ejemplo, PGDBP) pueden ser saquitos tubulares u otras formas de dosificación unitaria.

30 **Nivel de contaminación**

En algunas realizaciones, el estándar de referencia es el nivel de contaminación. Cuando se combinan las materias

primas, por ejemplo, las entidades de aminoácido de grado farmacéutico y/o los excipientes, en una combinación, por ejemplo, preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP, los contaminantes pueden estar presentes en la combinación.

5 Una combinación, por ejemplo, una preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP, cumple un estándar para un nivel de contaminación cuando la combinación no comprende sustancialmente (por ejemplo, comprende menos del 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.15, 0.1, 0.05, 0.01, o el 0.001 %

10 (p/p) de) un contaminante. En algunas realizaciones, una combinación, por ejemplo, una preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP, comprende menos del 0.15 % (p/p) de un contaminante. En algunas realizaciones, una combinación, por ejemplo, una preparación mezclada en seco, por ejemplo,

15 PGDBP, comprende un menor nivel de un contaminante que el nivel permisible en los alimentos (por ejemplo, tal como se define por las organizaciones reguladoras apropiadas conocidas en la materia). En algunas realizaciones, una combinación, por ejemplo, una preparación mezclada en seco,

20 por ejemplo, PGDBP, descrita en un método en el presente documento no comprende un contaminante. Los contaminantes incluyen cualquier sustancia que no está deliberadamente presente en la combinación, por ejemplo, preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP (por ejemplo,

25 entidades de aminoácido de grado farmacéutico y excipientes, por ejemplo, componentes de administración oral, están deliberadamente presentes) o cualquier sustancia que tiene un efecto negativo no intencionado sobre un parámetro de calidad de un producto de la PGDBP o

30 la pluralidad de porciones de la PGDBP (por ejemplo, efectos secundarios en un sujeto, potencia reducida, estabilidad/vida útil reducida, decoloración, olor, mal

sabor, mala textura/sensación al paladar, o una elevada segregación de los componentes de la PGDBP). En algunas realizaciones, los contaminantes incluyen microbios, endotoxinas, metales (por ejemplo, metales pesados),
5 disolventes residuales, impurezas de materias primas, extraíbles y/o lixiviables. En algunas realizaciones, una combinación, por ejemplo, preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP, comprende un nivel de contaminante (por ejemplo, no comprende sustancialmente un contaminante) que
10 cumple con un estándar de referencia, por ejemplo, un estándar promulgado por una agencia conocida por los expertos en la materia o descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, una combinación, por ejemplo, preparación mezclada en seco, por ejemplo, PGDBP, comprende
15 un nivel de contaminante (por ejemplo, no comprende sustancialmente un contaminante) que cumple con un estándar de la ICH, por ejemplo, las Impurezas Q3A de la ICH en el estándar de Nuevas sustancias farmacológicas.

En algunas realizaciones, los métodos descritos
20 en el presente documento comprenden además adquirir un valor para el nivel de un contaminante en un punto de muestreo en uno o ambos de la combinación o la PGDBP. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden además adquirir un valor para el nivel
25 de un contaminante en cada uno de una pluralidad de puntos en uno o ambos de la combinación o la PGDBP o en una porción de prueba (por ejemplo, de la combinación o la PGDBP). En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden además adquirir un valor
30 para el nivel de un contaminante en una porción, por ejemplo, una porción de prueba de la pluralidad de porciones. En algunas realizaciones, en respuesta al valor

del nivel del contaminante, por ejemplo, y para determinar que se cumple un estándar para el nivel de contaminación, los métodos descritos en el presente documento comprenden además seleccionar y ejecutar una etapa de procesamiento

5 aguas abajo, por ejemplo, dividiendo la PGDBP en porciones (por ejemplo, porcionamiento) y acabado de relleno (por ejemplo, formulación (por ejemplo, con excipientes), empaquetamiento y marcaje) y distribución. En algunas realizaciones, en respuesta al valor del nivel del

10 contaminante, por ejemplo, y para determinar que no se cumple un estándar para el nivel de contaminación, los métodos descritos en el presente documento comprenden además seleccionar y ejecutar una etapa de procesamiento diferente aguas abajo, por ejemplo, purificación y/o

15 retirada del contaminante o eliminación de la porción, pluralidad de porciones o PGDBP.

Composiciones dietéticas

La composición (por ejemplo, Resto Activo) que incluye

20 entidades de aminoácido, se puede formular y usar como una composición dietética, por ejemplo, elegida de un alimento médico, un alimento funcional o un suplemento. En tal realización, las materias primas y el producto final deberían cumplir los estándares de un producto alimenticio.

25 La composición de cualquiera de los aspectos y de las realizaciones desveladas en el presente documento pueden ser para su uso como una composición dietética, por ejemplo, elegida de un alimento médico, un alimento funcional o un suplemento. En algunas realizaciones, la

30 composición dietética es para su uso en un método, que comprende administrar la composición a un sujeto. La composición puede ser para su uso en una composición

dietética para el fin de mejorar una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (por ejemplo, todas) de la función, el recambio o la síntesis de eritrocitos; la función, el recambio o la síntesis de hemoglobina; la
5 función vascular; el estrés oxidativo (por ejemplo, uno o ambos de estrés oxidativo en sangre y sistémico); o la inflamación.

En algunas realizaciones, la composición dietética se elige de un alimento médico, un alimento funcional o un
10 suplemento. En algunas realizaciones, la composición está en la forma de un suplemento nutricional, una formulación dietética, un alimento funcional, un alimento médico, un alimento o una bebida que comprende una composición descrita en el presente documento. En algunas
15 realizaciones, el suplemento nutricional, la formulación dietética, el alimento funcional, el alimento médico, el alimento o la bebida que comprende una composición descrita en el presente documento para su uso en la gestión de una hemoglobinopatía (por ejemplo, un sujeto con
20 drepanocitosis) o una talasemia.

La presente divulgación presenta un método de mejora de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (por ejemplo, todas) de la función, el recambio o la síntesis de eritrocitos; la función, el recambio o la
25 síntesis de hemoglobina; la función vascular; el estrés oxidativo (por ejemplo, uno o ambos de estrés oxidativo en sangre y sistémico); o la inflamación, que comprende administrar, a un sujeto, una cantidad eficaz de una composición dietética descrita en el presente documento.

30 La presente divulgación presenta un método de proporcionar soporte o suplementación nutricional a un sujeto con una hemoglobinopatía (por ejemplo, un sujeto con

drepanocitosis) o una talasemia, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición descrita en el presente documento.

La presente divulgación presenta un método de
5 proporcionar soporte o suplementación nutricional que ayuda en la gestión de una hemoglobinopatía (por ejemplo, una drepanocitosis) o una talasemia, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una composición descrita en el presente documento.

10 En algunas realizaciones, el método es un método no terapéutico. En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden los restos activos descritas en el presente documento se usan de formas no terapéuticas, tales como para proporcionar nutrición, mantener la salud o mejorar el
15 aspecto cosmético en sujetos sanos. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, el uso de las composiciones descritas en el presente documento como suplementos dietéticos o como alimento. Las composiciones de la presente solicitud se pueden usar para nutrir o mantener la salud de diversos
20 elementos en el sistema circulatorio, tal como en vasos sanguíneos, sangre, eritrocitos, hemoglobina y/o el sistema vascular.

Las composiciones se pueden usar en métodos de gestión dietética de un sujeto (por ejemplo, un sujeto sin una
25 hemoglobinopatía o una talasemia). En algunas realizaciones, el sujeto no ha tenido una hemoglobinopatía o una talasemia.

En algunas realizaciones, el sujeto está en riesgo de, o ha sido diagnosticado con una hemoglobinopatía (por
30 ejemplo, una β -hemoglobinopatía) o una talasemia. En ciertas realizaciones, la hemoglobinopatía es una

drepanocitosis. En ciertas realizaciones, la talasemia es β -talasemia.

En algunas realizaciones, la drepanocitosis se elige de anemia de células falciformes (HbSS), enfermedad de
5 hemoglobina SC (HbSC), talasemia falciforme β^+ (HbS/ β^+),
talasemia falciforme β^0 (HbS/ β^0), enfermedad de hemoglobina
SE, enfermedad de hemoglobina SD o enfermedad de
hemoglobina SO.

10 EJEMPLOS

Los ejemplos a continuación se exponen para ayudar en la comprensión de las invenciones, pero no pretenden y no deberían interpretarse como limitantes de su alcance en ningún caso.

15

Introducción

Las composiciones que comprenden entidades de aminoácidos se probaron en modelos de células primarias humanas normales y específicas de la enfermedad. Los
20 sistemas modelo se llevaron a cabo en ambientes que tienen como objetivo estimular los niveles fisiológicos de los biofluidos y de los nutrientes. Estos modelos incluyen condiciones de enfermedad (por ejemplo, inflamación) para aislar y comprender mejor los efectos de las composiciones
25 sobre subconjuntos de vías metabólicas. La naturaleza de alto rendimiento de estos modelos permitió el descubrimiento de combinaciones específicas de entidades de aminoácidos que pueden tener efectos beneficiosos de múltiples vías en sujetos con hemoglobinopatía (por
30 ejemplo, drepanocitosis) o talasemia (por ejemplo, α -talasemia o β -talasemia).

Ejemplo 1. Secreción de citocinas en macrófagos humanos primarios.

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

5 Se vertieron cuidadosamente capas leucoplaquetarias sin purificar (Research Blood Components) en tubos de centrífuga de 50 ml y se diluyeron con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (dPBS) a temperatura ambiente con calcio y magnesio (Gibco). Las capas
10 leucoplaquetarias diluidas se dividieron posteriormente en cuatro tubos de centrífuga totales de 50 ml a 20 ml por tubo. Se pipeteó cuidadosamente medio de separación de linfocitos (Corning) en la parte inferior de cada tubo de centrífuga. Las mezclas se centrifugaron a 850 X g durante
15 32 minutos a 20°C con 0 deceleración y aceleración.

La capa de PBMC se separó de otros componentes después de la centrifugación y se añadió a un nuevo tubo de centrífuga de 50 ml que contenía 25 ml de dPBS. El volumen total se llevó hasta 50 ml con dPBS y se centrifugó a 600 X
20 g durante 10 minutos a 20 °C con aceleración de 9, deceleración de 5. El sobrenadante se retiró cuidadosamente de los sedimentos celulares. Los sedimentos celulares se resuspendieron usando 10 ml de dPBS. El volumen total se llevó después hasta 50 ml usando dPBS y se centrifugó a 450
25 X g durante 5 minutos a 20 °C con aceleración de 9, deceleración de 9. De nuevo, se repitió la retirada del sobrenadante y la resuspensión de los sedimentos celulares.

Después se retiró el sobrenadante cuidadosamente de los sedimentos celulares. Los sedimentos celulares se
30 resuspendieron en 10 ml de dPBS sin calcio o magnesio y se filtraron a través de un filtro de células de 70 µm. El número total de PBMC se determinó usando un contador de

células automático Cellometer K2. Se guardaron un total de 5E6 células para los análisis de citometría de flujo. Las células restantes se centrifugaron a 490 X g durante 5 minutos a 20 °C con aceleración de 9, deceleración de 9.

5 **Selección de células CD14+**

Las células CD14+ se seleccionaron usando el Kit II de selección de CD14 positivas humanas EasySep™ (STEMCELL Technologies). Las células se resuspendieron en tampón EasySep™ frío (STEMCELL Technologies) a 1x10⁸ células/ml.

10 Se añadió un total de 100 ul/ml de mezcla II de selección de CD14 positivas humanas EasySep™ a la suspensión de células, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron un total de 100 ul/ml de RapidSpheres a la mezcla y se incubó a temperatura ambiente

15 durante 3 minutos después del mezclado, después se añadió tampón RoboSep para llevar el volumen total a 10 ml. La mezcla en un tubo de 15 ml se colocó en un imán y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 10 ml de tampón reciente

20 EasySep™ al tubo de 15 ml. La adición del tampón RoboSep, el mezclado y el descarte del sobrenadante se repitió dos veces más.

Las fracciones negativa y positiva se centrifugaron a 490 X g durante 5 minutos a 20 °C con aceleración de 9,

25 deceleración de 9, y se resuspendió en DMEM (Gibco) y suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (Atlanta Bio) y Penicilina/Estreptomicina. Las células se contaron y se centrifugaron de nuevo a 490 X g durante 5 minutos a 20 °C con aceleración de 9, deceleración de 9. Después de la

30 centrifugación, las células se resuspendieron en DMEM (Gibco) y suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (Atlanta Bio) y Penicilina/Estreptomicina que contiene 500

U/ml de GM- y se colocaron en una placa a $1-2 \times 10^6$ células/ml en placas de cultivo tisular de 10 cm. Las células se mantuvieron a 37 °C y CO₂ al 5 % entre las alimentaciones/recolección.

5 **Alimentación de células CD14+**

Las células se alimentaron cada 3-4 días retirando medio y células no unidas, centrifugando a 490 X g durante 5 minutos a 20 C con aceleración de 9, deceleración de 9 y resuspensión en DMEM reciente (Gibco) y suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (Atlanta Bio) y Penicilina/Estreptomicina que contiene GM-CSF. Las células resuspendidas se volvieron a sembrar en placas de cultivo tisular de 10 cm y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 %. Los macrófagos diferenciados se usaron para los posteriores experimentos.

15 **Cribado**

Los macrófagos derivados de PBMC humanos se sembraron en el día 0 a 3.0×10^4 células por pocillo en microplacas de 96 pocillos (ThermoFisher) en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado con penicilina-estreptomicina (Hyclone) y suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (HI-FBS) (Atlanta Bio) y se incubaron toda la noche a 37 °C, con CO₂ al 5 %. En el día 1, las células se lavaron una vez con 150 ul por pocillo de DPBS (Gibco) y se trataron con 75 ul de:

- 25 a. DMEM libre de aminoácidos (US Biologicals) que contiene una concentración de aminoácido personalizada basada en las concentraciones fisiológicas medias en sangre basadas en valores publicados en la base de datos de metaboloma de humano (HMDB), con glucosa 6 mM, piruvato de
- 30

sodio 1 mM, HEPES 10 mM, primocina al 0.2 %
(InVivoGen); o

- b. El mismo medio descrito anteriormente con un aminoácido en diversas concentraciones que
5 incluye el abandono completo.

En el día 2, las células se trataron con 75 ul de los mismos medios descritos anteriormente suplementados con 0.30 ng/ml de lipopolisacárido (LPS) (Sigma) para una concentración final de 0.15 ng/ml de LPS. Los pocillos de control se trataron con BX-795 1 uM (Tocis), TAK242 1 uM (Sigma), 0.15 ng/ml de LPS o solución salina tamponada con fosfato (PBS).
10

En el día 3, se recolectó el sobrenadante y se congeló inmediatamente en un congelador a -80 °C. Las células se lavaron una vez con 150 ul de DPBS y se evaluó la viabilidad usando el ensayo de citotoxicidad de proliferación de células WST-8 (Dojindo). Tras el ensayo, las células se lavaron dos veces con 150 ul de PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 5 min seguido por dos lavados adicionales con 150 ul de PBS. Los niveles de proteína en las muestras de sobrenadante se analizaron mediante ELISA para IL-6 y TNFa usando kits comercialmente disponible (R&D Systems) de acuerdo con los protocolos suministrados por el fabricante. Los resultados se muestran en las Tablas 7-12 a continuación.
15
20
25

Tabla 7. Mediciones de IL-6: Donante 1

Suplemento de aminoácido	Conc. (X)	Mediciones de IL-6 del donante 1				
		Media	Desviación típica	Número de valores	P-valor*	Significación
LIVRQNAC	40	-619.787	114.1592	3	0.0001	****
LIVRQNAC	30	-525.849	63.87122	3	0.0001	****
LIVRQNAC	20	-290.199	33.5584	3	0.0092	**
LIVRQNAC	10	51.81434	183.3933	3	0.9479	ns
LIVRQNAC	1	0	148.7761	3	nd	nd
LIVRQNAC+G	40	-1099.11	44.1139	3	0.0001	****
LIVRQNAC+G	30	-903.836	107.7113	3	0.0001	****
LIVRQNAC+G	20	-616.626	114.7826	3	0.0001	****
LIVRQNAC+G	10	-367.918	98.44611	3	0.0007	***
LIVRQNAC+G	1	0	172.9553	3	nd	nd
LIVRQNAC+S	40	-968.997	90.53282	3	0.0001	****
LIVRQNAC+S	30	-798.326	52.89122	3	0.0001	****
LIVRQNAC+S	20	-506.804	63.85224	3	0.0001	****
LIVRQNAC+S	10	-243.259	114.742	3	0.0365	*
LIVRQNAC+S	1	0	259.8506	3	nd	nd
LIV	40	4.918642	62.7077	3	0.9999	ns
LIV	30	86.01907	128.1151	3	0.7604	ns
LIV	20	112.1501	83.62436	3	0.564	ns
LIV	10	54.22668	63.10515	3	0.9392	ns
LIV	1	0	75.98804	3	nd	nd
LIVRQ	40	322.0706	73.87715	3	0.0033	**
LIVRQ	30	297.8004	34.60168	3	0.0072	**
LIVRQ	20	604.021	203.8836	3	0.0001	****
LIVRQ	10	289.1798	57.78952	3	0.0095	**
LIVRQ	1	0	93.58494	3	nd	nd
RQNAC	40	-911.011	12.65475	3	0.0001	****
RQNAC	30	-766.912	26.23659	3	0.0001	****
RQNAC	20	-511.403	32.15983	3	0.0001	****
RQNAC	10	-201.63	6.477522	3	0.1054	ns
RQNAC	1	0	174.9658	3	nd	nd
N-acetilcisteína	40	-914.194	56.77271	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	20	-553.802	85.27013	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	10	-121.142	53.05191	3	0.4973	ns

N-acetilcisteína	5	308.1772	263.4651	3	0.0052	**
N-acetilcisteína	0	0	45.08485	3	nd	nd

Suplemento de aminoácido	Conc. (µM)	Mediciones de IL-6 del donante 1				
		Media	Desviación típica	Número de valores	P-valor*	Significación
Valina	23420	-106.268	155.3559	3	0.7885	ns
Valina	11710	-97.25	77.26313	3	0.8339	ns
Valina	4684	-85.9843	74.99317	3	0.8841	ns
Valina	234	0	124.8497	3	nd	nd
Arginina	5440	357.4394	154.8508	3	0.0159	*
Arginina	2720	-186.57	85.86105	3	0.3477	ns
Arginina	1088	-181.36	131.6475	3	0.3722	ns
Arginina	109	0	282.0306	3	nd	nd
Glutamina	22484	440.1437	114.443	3	0.0022	**
Glutamina	11242	397.1745	23.36272	3	0.0064	**
Glutamina	3747	291.5443	81.30853	3	0.0623	ns
Glutamina	749	0	73.06692	3	nd	nd
Isoleucina	6639	-218.332	146.5098	3	0.221	ns
Isoleucina	3320	-15.8843	89.88616	3	0.9998	ns
Isoleucina	1328	25.98372	323.6109	3	0.9984	ns
Isoleucina	66	0	48.21125	3	nd	nd
Leucina	15270	84.46122	68.15253	3	0.8902	ns
Leucina	7635	-69.9873	99.00843	3	0.9398	ns
Leucina	3054	244.9743	355.6551	3	0.1442	ns
Leucina	153	0	61.85589	3	nd	nd

El tratamiento con LIVRQNAC, LIVRQNAC + G, LIVRQNAC + S, RQNAC y NAC redujo significativamente la secreción de IL-6 inducida por LPS en macrófagos obtenidos de monocitos humanos primarios. El tratamiento con LIVRQ aumentó significativamente la secreción de IL-6, mientras que LIV no tuvo efecto. La arginina y la glutamina administradas solas aumentaron la secreción de IL-6 mientras que otros

aminoácidos solos no efectuaron la secreción de IL-6. Se realizaron las comparaciones múltiples de Dunnett de ANOVA de dos vías para el análisis estadístico. Valores medios representados como valores restados del inicial.

5 **Tabla 8. Mediciones de IL-6: Donante 2**

Suplemento de aminoácido	Conc. (X)	Mediciones de IL-6 del donante 2				
		Media	Desviación típica	Número de valores	P-valor*	Significación
LIVRQNAC	40	-27.1916	1.853569	3	0.0003	***
LIVRQNAC	30	-21.5766	1.709414	3	0.0045	**
LIVRQNAC	20	-8.20655	8.458638	3	0.5143	ns
LIVRQNAC	10	-1.71581	6.104437	3	0.9965	ns
LIVRQNAC	1	-2.4E-15	11.85079	3		
LIVRQNAC+G	40	-33.2001	3.55425	3	0.0001	****
LIVRQNAC+G	30	-30.8468	0.854995	3	0.0001	****
LIVRQNAC+G	20	-18.4318	4.870421	3	0.0187	*
LIVRQNAC+G	10	14.63551	21.82024	3	0.0824	ns
LIVRQNAC+G	1	2.37E-15	8.607557	3		
LIVRQNAC+S	40	-26.5993	2.963677	3	0.0004	***
LIVRQNAC+S	30	-14.2166	1.460268	3	0.0954	ns
LIVRQNAC+S	20	-8.2522	2.917345	3	0.5095	ns
LIVRQNAC+S	10	8.127841	1.783214	3	0.5227	ns
LIVRQNAC+S	1	0	6.232673	3		
LIV	40	34.10306	1.950493	3	0.0001	****
LIV	30	31.10835	9.757211	3	0.0001	****
LIV	20	20.32684	3.17293	3	0.0081	**
LIV	10	15.10204	9.179111	3	0.0697	ns
LIV	1	-7.1E-15	4.738966	3		
LIVRQ	40	49.62156	17.37012	3	0.0001	****
LIVRQ	30	42.9625	7.798872	3	0.0001	****
LIVRQ	20	48.38603	13.08566	3	0.0001	****
LIVRQ	10	45.99191	15.19687	3	0.0001	****
LIVRQ	1	1.18E-15	6.324379	3		
RQNAC	40	-36.5521	1.877658	3	0.0001	****
RQNAC	30	-26.3768	0.744676	3	0.0004	***
RQNAC	20	-18.7428	1.353649	3	0.0164	*
RQNAC	10	-3.74427	4.74578	3	0.9393	ns
RQNAC	1	2.37E-15	12.26314	3		
N-acetilcisteína	40	-33.7585	0.895842	3	0.0001	****

N-acetilcisteína	20	-24.9999	1.083467	3	0.0008	***
N-acetilcisteína	10	-9.75111	2.381012	3	0.3617	ns
N-acetilcisteína	5	-0.79458	5.988677	3	0.9998	ns
N-acetilcisteína	0	-2.4E-15	1.900091	3		

Suplemento de aminoácido	Conc. (µM)	Mediciones de IL-6 del donante 2				
		Media	Desviación típica	Número de valores	P-valor*	Significación
Valina	23420	4.395899	10.35903	3	0.973	ns
Valina	11710	-1.19605	7.303571	3	0.9998	ns
Valina	4684	-4.52846	4.069907	3	0.97	ns
Valina	234	-4.7E-15	9.361734	3		
Arginina	5440	-12.4164	0.292618	3	0.5017	ns
Arginina	2720	-13.6102	2.1177	3	0.4207	ns
Arginina	1088	-9.70116	9.286942	3	0.6995	ns
Arginina	109	2.37E-15	14.30728	3		
Glutamina	22484	34.38845	7.467725	3	0.0026	**
Glutamina	11242	63.31441	35.02748	3	0.0001	****
Glutamina	3747	22.51543	9.686139	3	0.0721	ns
Glutamina	749	2.37E-15	2.203881	3		
Isoleucina	6639	-1.77438	10.22772	3	0.999	ns
Isoleucina	3320	2.305485	1.328015	3	0.9975	ns
Isoleucina	1328	-2.31776	9.121049	3	0.9974	ns
Isoleucina	66	0	12.3413	3		
Leucina	15270	47.59735	16.64049	3	0.0001	****
Leucina	7635	30.46065	7.144005	3	0.0087	**
Leucina	3054	29.60609	13.39676	3	0.0111	*
Leucina	153	7.11E-15	6.308577	3		

- El tratamiento con LIVRQNAC, LIVRQNAC + G, LIVRQNAC + S, RQNAC y NAC redujo significativamente la secreción de IL-6 inducida por LPS en macrófagos obtenidos de monocitos
- 5 humanos primarios. El tratamiento con LIVRQ y LIV aumentó significativamente la secreción de IL-6. La glutamina y la leucina administradas solas aumentaron la secreción de IL-6 mientras que los otros aminoácidos solos no tuvieron efecto. Se realizaron las comparaciones múltiples de

Dunnett de ANOVA de dos vías para el análisis estadístico. Valores medios representados como valores restados del inicial.

5 **Tabla 9. Mediciones de IL-6: Donante 3**

Suplemento de aminoácido	Conc. (X)	Mediciones de IL-6 del donante 3				
		Media	Desviación típica	Número de valores	P-valor*	Significación
LIVRQNAC	40	-18.2445	4.129349	3	0.7529	ns
LIVRQNAC	30	-16.8219	1.366045	3	0.8001	ns
LIVRQNAC	20	-13.4826	12.48206	3	0.8948	ns
LIVRQNAC	10	-34.4539	37.38053	3	0.2356	ns
LIVRQNAC	1	-1.4E-14	14.03982	3		
LIVRQNAC+G	40	-54.4799	5.467815	3	0.0228	*
LIVRQNAC+G	30	-48.3118	1.960574	3	0.0513	ns
LIVRQNAC+G	20	-55.792	7.763897	3	0.019	*
LIVRQNAC+G	10	-44.8309	14.34972	3	0.0783	ns
LIVRQNAC+G	1	0	26.01471	3		
LIVRQNAC+S	40	-14.5337	15.82418	3	0.868	ns
LIVRQNAC+S	30	-25.9127	10.00119	3	0.479	ns
LIVRQNAC+S	20	-25.8862	21.61536	3	0.48	ns
LIVRQNAC+S	10	-11.9742	10.3333	3	0.9277	ns
LIVRQNAC+S	1	-4.3E-14	15.34164	3		
LIV	40	10.21257	37.58938	3	0.9576	ns
LIV	30	-32.6891	24.862	3	0.2771	ns
LIV	20	27.66715	39.40901	3	0.4207	ns
LIV	10	9.44789	71.20002	3	0.9677	ns
LIV	1	-4.7E-14	27.50075	3		
LIVRQ	40	74.9145	12.55033	3	0.001	***
LIVRQ	30	120.1764	20.21514	3	0.0001	****
LIVRQ	20	77.12007	11.45452	3	0.0007	***
LIVRQ	10	67.95483	43.58345	3	0.003	**
LIVRQ	1	-2.4E-14	27.62048	3		
RQNAC	40	-45.9765	5.740028	3	0.0683	ns
RQNAC	30	-53.3845	16.45009	3	0.0265	*
RQNAC	20	-65.6761	3.400465	3	0.0044	**
RQNAC	10	-32.8776	33.99103	3	0.2724	ns
RQNAC	1	-2.8E-14	23.14404	3		
N-acetilcisteína	40	-140.851	4.662272	3	0.0001	****

N-acetilcisteína	20	-122.656	8.219985	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	10	-103.586	28.4385	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	5	-70.3269	8.563896	3	0.0021	**
N-acetilcisteína	0	-9.5E-15	11.75797	3		

Suplemento de aminoácido	Conc. (µM)	Mediciones de IL-6 del donante 3				
		Media	Desviación típica	Número de valores	P-valor*	Significación
Valina	23420	-29.2004	25.98066	3	0.4329	ns
Valina	11710	-43.8022	8.331697	3	0.1239	ns
Valina	4684	-30.0609	8.478329	3	0.4072	ns
Valina	234	4.26E-14	17.2027	3		
Arginina	5440	-6.80983	0.643932	3	0.9922	ns
Arginina	2720	-7.50318	22.06663	3	0.9888	ns
Arginina	1088	31.5786	70.48311	3	0.3642	ns
Arginina	109	0	17.26952	3		
Glutamina	22484	108.5158	55.59202	3	0.0001	****
Glutamina	11242	98.4903	58.37	3	0.0001	****
Glutamina	3747	25.35457	16.40416	3	0.556	ns
Glutamina	749	3.79E-14	16.54987	3		
Isoleucina	6639	-16.3663	8.09174	3	0.9718	ns
Isoleucina	3320	0	19.80362	3	0.9928	ns
Isoleucina	1328	-28.9897	13.10903	3	0.6593	ns
Isoleucina	66	-6.69039	13.72995	3		
Leucina	15270	#	#	3	#	#
Leucina	7635	#	#	3	#	#
Leucina	3054	#	#	3	#	#
Leucina	153	#	#	3	#	#
#	La leucina no se midió en el Exp3 debido a un error técnico					

El tratamiento con LIVRQNAC + G, LIVRQNAC + S, RQNAC y NAC redujo significativamente la secreción de IL-6 inducida por LPS en macrófagos obtenidos de monocitos humanos primarios.

- El tratamiento con LIVRQ aumentó la secreción de IL-6, mientras que LIV y LIVRQNAC no tuvieron efectos significativos sobre la secreción de IL-6. La glutamina administrada sola aumentó significativamente la secreción

de IL-6 mientras que los otros aminoácidos solos no tuvieron efecto. Se realizaron las comparaciones múltiples de Dunnett de ANOVA de dos vías para el análisis estadístico. Valores medios representados como valores restados del inicial.

Tabla 10. Mediciones de TNFalfa: Donante 1

Suplemento de aminoácido	Conc. (X)	Mediciones de TNFa del donante 1				
		Media	Desviación típica	Número de valores	P-valor*	Significación
LIVRQNAC	40	422.74	4.347575	3	0.0001	****
LIVRQNAC	30	389.74	1.004633	3	0.0001	****
LIVRQNAC	20	336.69	3.007435	3	0.0001	****
LIVRQNAC	10	246.04	27.61929	3	0.0001	****
LIVRQNAC	1	0	36.31082	3		
LIVRQNAC+G	40	490.92	4.427614	3	0.0001	****
LIVRQNAC+G	30	447.73	9.819865	3	0.0001	****
LIVRQNAC+G	20	377.32	5.837159	3	0.0001	****
LIVRQNAC+G	10	268.29	9.642365	3	0.0001	****
LIVRQNAC+G	1	0	37.44353	3		
LIVRQNAC+S	40	415.03	4.800449	3	0.0001	****
LIVRQNAC+S	30	379.44	4.694868	3	0.0001	****
LIVRQNAC+S	20	323.77	7.971135	3	0.0001	****
LIVRQNAC+S	10	209.59	21.15676	3	0.0001	****
LIVRQNAC+S	1	0	30.0492	3		
LIV	40	60.37	20.26331	3	0.0065	**
LIV	30	42.09	22.95664	3	0.0865	ns
LIV	20	63.37	37.24144	3	0.004	**
LIV	10	45.61	44.71078	3	0.0556	ns
LIV	1	0	10.49958	3		
LIVRQ	40	6.38	17.1283	3	0.9909	ns
LIVRQ	30	-6.72	18.9622	3	0.989	ns
LIVRQ	20	38.38	39.85515	3	0.1333	ns
LIVRQ	10	-18.95	10.84371	3	0.6982	ns
LIVRQ	1	0	36.96184	3		

RQNAC	40	- 408.44	1.179877	3	0.0001	****
RQNAC	30	- 390.41	1.341282	3	0.0001	****
RQNAC	20	-338.2	3.284307	3	0.0001	****
RQNAC	10	- 251.35	4.121085	3	0.0001	****
RQNAC	1	0	51.06933	3		
N-acetilcisteína	40	- 644.49	2.42197	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	20	- 561.33	8.435064	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	10	- 446.88	12.22132	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	5	- 326.24	11.10173	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	0	0	42.00516	3		

Suplemento de aminoácido	Conc. (µM)	Mediciones de TNFa del donante 1				
		Media	Desviación típica	Número de valores	P-valor*	Significación
Valina	23420	-14.98	20.86784	3	0.9928	ns
Valina	11710	-41.77	36.61662	3	0.7784	ns
Valina	4684	-40.37	32.31016	3	0.7974	ns
Valina	234	0	24.8661	3		
Arginina	5440	62.06	48.80326	3	0.4786	ns
Arginina	2720	5.12	15.47951	3	0.9998	ns
Arginina	1088	-24.33	17.74317	3	0.9577	ns
Arginina	109	0	18.5366	3		
Glutamina	22484	- 103.07	27.02483	3	0.0985	ns
Glutamina	11242	-65.24	23.02631	3	0.4346	ns
Glutamina	3747	-45.7	28.56445	3	0.7222	ns
Glutamina	749	0	30.75138	3		
Isoleucina	6639	-40.95	78.56369	3	0.7896	ns
Isoleucina	3320	-96.3	45.66981	3	0.1339	ns
Isoleucina	1328	-42.68	21.07739	3	0.7657	ns
Isoleucina	66	0	115.9559	3		
Leucina	15270	-46.21	29.00402	3	0.7148	ns
Leucina	7635	-23.04	40.08864	3	0.965	ns
Leucina	3054	42.04	77.19161	3	0.7746	ns
Leucina	153	0	157.6578	3		

El tratamiento con LIVRQNAC, LIVRQNAC + G, LIVRQNAC + S, RQNAC y NAC redujo significativamente la secreción de TNF-a

inducida por LPS en macrófagos obtenidos de monocitos humanos primarios. El tratamiento con LIV aumentó la secreción de TNF- α , mientras que LIVRQ no tuvo efectos significativos sobre la secreción de TNF α . Ninguno de los aminoácidos administrados individualmente tuvo un efecto sobre la secreción de TNF α . Se realizaron las comparaciones múltiples de Dunnett de ANOVA de dos vías para el análisis estadístico. Valores medios representados como valores restados del inicial.

10

Tabla 11. Mediciones de TNF α : Donante 2

Suplemento de aminoácido	Conc. (X)	Mediciones de TNF α del donante 2				
		Media	Desviación típica	Número de valores	P-valor*	Significación
LIVRQNAC	40	-98.1341	2.118962	3	0.0001	****
LIVRQNAC	30	-85.1019	1.385677	3	0.0001	****
LIVRQNAC	20	-64.3364	10.07525	3	0.0001	****
LIVRQNAC	10	-38.3512	5.120689	3	0.0001	****
LIVRQNAC	1	0	5.45587	3		
LIVRQNAC+G	40	-91.3454	5.994009	3	0.0001	****
LIVRQNAC+G	30	-82.4397	4.200763	3	0.0001	****
LIVRQNAC+G	20	-61.247	8.702492	3	0.0001	****
LIVRQNAC+G	10	-23.9913	7.471422	3	0.008	**
LIVRQNAC+G	1	-4.7E-15	4.578295	3		
LIVRQNAC+S	40	-74.1572	4.163823	3	0.0001	****
LIVRQNAC+S	30	-64.0016	5.549308	3	0.0001	****
LIVRQNAC+S	20	-47.5673	3.970363	3	0.0001	****
LIVRQNAC+S	10	-28.635	7.390447	3	0.0012	**
LIVRQNAC+S	1	-4.7E-15	7.564883	3		
LIV	40	49.84155	4.092799	3	****	0.0001
LIV	30	29.1118	14.72509	3	***	0.001
LIV	20	30.17595	5.797518	3	***	0.0006
LIV	10	16.68974	10.85983	3	ns	0.0974
LIV	1	0	10.41523	3		
LIVRQ	40	64.1705	27.82953	3	****	0.0001
LIVRQ	30	50.92104	6.955429	3	****	0.0001
LIVRQ	20	45.65882	19.0128	3	****	0.0001
LIVRQ	10	32.37038	19.44425	3	***	0.0002

LIVRQ	1	-4.7E-15	5.942707	3		
RQNAC	40	-84.147	5.821583	3	****	0.0001
RQNAC	30	-77.9626	1.626776	3	****	0.0001
RQNAC	20	-63.3754	3.494595	3	****	0.0001
RQNAC	10	-37.6072	1.88043	3	****	0.0001
RQNAC	1	-9.5E-15	4.727924	3		
N-acetilcisteína	40	-103.984	0.720962	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	20	-88.6528	0.668195	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	10	-70.8382	12.08717	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	5	-54.1596	11.06287	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	0	9.47E-15	2.926881	3		

Suplemento de aminoácido	Conc. (µM)	Mediciones de TNFa del donante 2				
		Media	Desviación típica	Número de valores	P-valor*	Significación
Valina	23420	-1.25079	12.85688	3	0.9991	ns
Valina	11710	-0.83505	8.524018	3	0.9998	ns
Valina	4684	-0.00221	5.127759	3	0.9999	ns
Valina	234	-4.7E-15	8.717375	3		
Arginina	5440	-0.57378	8.672536	3	0.9999	ns
Arginina	2720	-3.76334	2.467885	3	0.9594	ns
Arginina	1088	-12.7222	4.764842	3	0.2488	ns
Arginina	109	1.42E-14	3.511446	3		
Glutamina	22484	11.50181	6.216029	3	0.3311	ns
Glutamina	11242	20.03996	11.90208	3	0.0279	*
Glutamina	3747	9.338214	9.748253	3	0.5134	ns
Glutamina	749	-9.5E-15	7.275868	3		
Isoleucina	6639	19.25756	5.097831	3	0.0365	*
Isoleucina	3320	10.26061	7.861148	3	0.4307	ns
Isoleucina	1328	2.918887	1.921961	3	0.9836	ns
Isoleucina	66	4.74E-15	6.264135	3		
Leucina	15270	46.68507	11.63209	3	0.0001	****
Leucina	7635	41.97528	6.512087	3	0.0001	****
Leucina	3054	31.74019	11.56537	3	0.0002	***
Leucina	153	0	0.482598	3		

El tratamiento con LIVRQNAC, LIVRQNAC + G, LIVRQNAC + S, RQNAC y NAC redujo significativamente la secreción de TNF-a

inducida por LPS en macrófagos obtenidos de monocitos humanos primarios. El tratamiento con LIV y LIVRQ aumentó la secreción de TNFa. La leucina, isoleucina y glutamina administradas individualmente aumentaron la secreción de TNF-a mientras que los otros aminoácidos solos no tuvieron efecto. Se realizaron las comparaciones múltiples de Dunnett de ANOVA de dos vías para el análisis estadístico. Valores medios representados como valores restados del inicial.

10

Tabla 12. Mediciones de TNFalfa: Donante 3

Suplemento de aminoácido	Conc. (X)	Mediciones de TNFa del donante 3				
		Media	Desviación típica	Número de valores	P-valor*	Significación
LIVRQNAC	40	-18.7507	2.487301	3	0.0001	****
LIVRQNAC	30	-15.5979	0.932399	3	0.0006	***
LIVRQNAC	20	-10.7042	3.013527	3	0.026	*
LIVRQNAC	10	-8.49034	2.434812	3	0.1029	ns
LIVRQNAC	1	0	4.067982	3		
LIVRQNAC+G	40	-14.6552	3.149813	3	0.0013	**
LIVRQNAC+G	30	-11.6973	2.026588	3	0.0129	*
LIVRQNAC+G	20	-8.0218	0.671662	3	0.1331	ns
LIVRQNAC+G	10	-4.8035	1.658348	3	0.5453	ns
LIVRQNAC+G	1	-2.4E-15	5.625453	3		
LIVRQNAC+S	40	-14.247	1.800575	3	0.0018	**
LIVRQNAC+S	30	-15.1388	1.568817	3	0.0009	***
LIVRQNAC+S	20	-12.4722	3.334857	3	0.0073	**
LIVRQNAC+S	10	-6.72057	1.833554	3	0.2549	ns
LIVRQNAC+S	1	0	4.171555	3		
LIV	40	14.07984	11.14252	3	0.002	**
LIV	30	1.759786	1.102706	3	0.9748	ns
LIV	20	14.51396	10.41503	3	0.0014	**
LIV	10	8.560957	12.86074	3	0.0989	ns
LIV	1	2.37E-15	3.660423	3		
LIVRQ	40	25.84453	0.659584	3	0.0001	****
LIVRQ	30	33.74883	5.974096	3	0.0001	****
LIVRQ	20	20.94481	2.163828	3	0.0001	****
LIVRQ	10	15.45187	3.942596	3	0.0007	***

LIVRQ	1	0	4.575346	3		
RQNAC	40	-21.5102	1.191926	3	0.0001	****
RQNAC	30	-20.8898	2.622446	3	0.0001	****
RQNAC	20	-19.9558	3.302225	3	0.0001	****
RQNAC	10	-9.09425	5.483242	3	0.0725	ns
RQNAC	1	0	6.189505	3		
N-acetilcisteína	40	-55.3093	0.809363	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	20	-48.4373	1.563179	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	10	-41.7266	3.533914	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	5	-33.6246	0.253484	3	0.0001	****
N-acetilcisteína	0	4.74E-15	8.55997	3		

Suplemento de aminoácido	Conc. (µM)	Mediciones de TNFa del donante 3				
		Media	Desviación típica	Número de valores	P-valor*	Significación
Valina	23420	3.688279	7.532913	3	0.8962	ns
Valina	11710	-2.59866	2.586099	3	0.9674	ns
Valina	4684	0.126	0.903014	3	0.9999	ns
Valina	234	-2.4E-15	2.731283	3		
Arginina	5440	-1.76662	4.067694	3	0.992	ns
Arginina	2720	-0.96691	4.86075	3	0.9991	ns
Arginina	1088	3.131153	10.346	3	0.9384	ns
Arginina	109	3.55E-15	4.325877	3		
Glutamina	22484	29.14034	17.71417	3	0.0001	****
Glutamina	11242	18.00238	14.58602	3	0.0061	**
Glutamina	3747	1.935546	2.127977	3	0.9887	ns
Glutamina	749	0	5.196592	3		
Isoleucina	6639	-1.66019	4.262718	3	0.9938	ns
Isoleucina	3320	3.308901	3.745411	3	0.9262	ns
Isoleucina	1328	-6.22991	0.48195	3	0.5976	ns
Isoleucina	66	-2.4E-15	3.844593	3		
Leucina	15270	#	#	3	#	#
Leucina	7635	#	#	3	#	#
Leucina	3054	#	#	3	#	#
Leucina	153	#	#	3	#	#

La leucina no se midió en el Exp3 debido a un error técnico

El tratamiento con LIVRQNAC, LIVRQNAC + G, LIVRQNAC + S, RQNAC y NAC redujo significativamente la secreción de TNF- α inducida por LPS en macrófagos obtenidos de monocitos humanos primarios. El tratamiento con LIV y LIVRQ aumentó la secreción de TNF α . Los aminoácidos administrados individualmente no tuvieron efecto significativo sobre la secreción de TNF α , salvo por la glutamina, que aumentó la secreción de TNF α . Se realizaron las comparaciones múltiples de Dunnett de ANOVA de dos vías para el análisis estadístico. Valores medios representados como valores restados del inicial.

Se ha propuesto que un desequilibrio de la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias se correlaciona con el desarrollo de crisis vasooclusivas (CVO) y su gravedad en la drepanocitosis (Sarray et al. 2015; se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad). Las CVO son una complicación de sello distintivo de la drepanocitosis que da como resultado lesiones isquémicas y dolor grave. Sarray et al. (2015) demostró que los aumentos de la citocina proinflamatoria IL-6 se correlacionaban con la duración de la CVO, junto con el enriquecimiento del enriquecimiento de los cuartiles altos en IL-6 y TNF α en el grupo de CVO, y que la IL-10 proinflamatoria reducida se correlacionaba con la frecuencia, el tipo, la gravedad y la duración de la CVO. En conjunto, sus resultados resaltan la importancia del equilibrio pro- y antiinflamatorio en la patología de la drepanocitosis.

Ejemplo 2. Especies reactivas de oxígeno en pacientes con drepanocitosis.

La desoxigenación de la hemoglobina da como resultado la producción de superóxido, que se amplifica cuando

aumenta la extracción de oxígeno, tal como ocurre durante la hipoxia, el flujo de sangre reducido o la anemia (Rogers et al. 2009). Como tal, los eritrocitos requieren una fuerte defensa antioxidante y sirven como un sumidero para las especies reactivas de oxígeno (ROS, Rogers et al. 2009). Se ha documentado que las ROS se generan a una mayor velocidad en la sangre completa y en los eritrocitos en pacientes con drepanocitosis que en controles sanos y tanto la abundancia de glutatión reducido (GSH) como la capacidad para reciclar GSH se ven alteradas, dando como resultado la oxidación de la proteína de membrana, la fragilidad de la membrana y la disfunción vascular (Amer et al. 2003, 2004, 2005, Rogers et al. 2013).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se usó para inducir ROS en muestras de sangre completa de controles sanos (Research Blood Components) y de pacientes con drepanocitosis (aprobación del IRB, Hospital pediátrico de Boston) siguiendo un protocolo adaptado de Amer et al. 2004. Las muestras de sangre completa se diluyeron de manera apropiada en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (DPBS, Life Technologies) y la concentración de los eritrocitos (Gr/ml) se midió en un contador de células viables fluorescentes Cellometer K2 de acuerdo con el protocolo RBC/AOPI del fabricante (Nexcelom Biosciences).

Las células se diluyeron después a 1×10^6 Gr/ml en DPBS precalentado a 37 °C o solución fisiológica tamponada con HEPES (HPS) tal como se adaptó de Wesseling et al. (2016) que contiene (mM): 145 de NaCl, 7.5 de KCl, 10 de glucosa, 10 de HEPES, 2 de $CaCl_2$, a pH 7.4 filtrado a 0.2μ , y suplementado con los 20 aminoácidos proteogénicos a 1x de las concentraciones basales presentes en la HMDB (Wishart

DS, Tzur D, Knox C, et al., HMDB: the Human Metabolome Database. Nucleic Acids Res. Enero de 2007;35(Número de la base de datos):D521-6. 17202168)) (Millipore Sigma). Se añadió diacetato de 2'-7'-diclorofluorescina (DCF, 5 Millipore Sigma), 20 mM en dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher) a una concentración de trabajo de 100 µM. Las células se incubaron con colorante durante 15 minutos a 37°C con CO₂ al 5 % en una incubadora de cultivo tisular, se lavaron una vez y se resuspendieron en los 0.9 volúmenes del mismo 10 tampón precalentado a 37°C con centrifugación de 5 minutos a 500 xg, acel/desacel=5 en una centrífuga de brazo oscilante (Beckman Coulter). Las células se distribuyeron en microplacas negras de fondo claro de 96 pocillos, 90 µl/pocillo (Corning) y después se añadieron 10 µl del mismo 15 tampón por pocillo que contiene opcionalmente aminoácidos individuales o combinaciones diseñadas para aumentar su concentración en 1x, 5x, 10x o 20x concentraciones basales presentes en la HMDB (Human Metabolome Database (Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al., HMDB: the Human Metabolome 20 Database. Nucleic Acids Res. Enero de 2007;35(Número de la base de datos):D521-6. 17202168)) o aminoácidos no proteogénicos hasta una concentración final de 0.1, 1, 2 o 5 mM. Cuando fue posible debido a limitaciones de solubilidad, se utilizaron soluciones madre de aminoácidos 25 ajustadas a un pH de 7.4. Los pocillos se mezclaron mediante pipeteo y las placas se incubaron a 37°C con CO₂ al 5 % en una incubadora de cultivo tisular durante 30 minutos. Opcionalmente, se añadió H₂O₂ 40 mM (Millipore Sigma) preparado recientemente en el mismo tampón para 30 llevar la concentración a 2 mM, los pocillos se mezclaron mediante pipeteo, y las placas se incubaron 30, 60, 120 o 240 minutos adicionales antes de la medición de

fluorescencia de la señal de ROS en un lector de microplaca Synergy H4 (BioTek) con excitación=488 nm y emisión=530 nm, y la ganancia se establece en ganancia automática, 75 o 100.

5 La N-acetilcisteína (Spectrum) y la cisteína redujeron las ROS medidas en la sangre completa de los donantes de control sanos tratados con H₂O₂ de una manera dependiente de la dosis y en muestras de sangre de pacientes con drepanocitosis, tanto tratadas con H₂O₂ como sin tratar en
10 DPBS. Además, el triptófano a 10x aumentó la señal de ROS tanto en la sangre de los donantes sanos como en la sangre de pacientes de drepanocitosis, lo que proporciona evidencia de su exclusión de la composición. Todos los otros aminoácidos probados no afectaron a la medición de
15 las ROS ni solos ni en combinación con NAC o cisteína, lo que demuestra que su inclusión en la composición no fue perjudicial para combatir el estrés oxidativo patológico en la drepanocitosis.

Ejemplo 3. Perfil de aminoácidos de eritrocitos.

20 Se han descrito las diferencias de concentración de aminoácidos en plasma y en eritrocitos en drepanocitosis y se cree que contribuyen a la disfunción endotelial. Por ejemplo, se ha descrito que la liberación de arginasa eritrocitaria a través de la hemólisis contribuye a una
25 menor arginina en plasma, contribuye a una biodisponibilidad limitada de este aminoácido y a un estado patológico de resistencia de óxido nítrico (NO) (Morris et al. 2005). Los estudios metabolómicos también han
30 identificado el nivel de aminoácidos y la desregulación de la vía, que se presume que contribuye a la patología de la enfermedad (Darghouth et al. 2011).

Los aminoácidos en plasma y en eritrocitos, así como el glutatión oxidado y reducido, se analizarán en muestras de sangre completas de pacientes con drepanocitosis (aprobación del IRB, Hospital pediátrico de Boston) así
5 como en sangre completa de controles sanos de la misma raza. Mientras que no es posible controlar el estado de alimentación o ayuno en el momento en el que se toman las muestras, las diferencias estadísticas entre las concentraciones de aminoácidos en plasma y en eritrocitos
10 en pacientes y en controles sanos se cree que representan grandes diferencias en el metabolismo en el estado patológico y pueden contribuir a la patología de la enfermedad. Los aminoácidos para los que se observan diferencias entre los controles sanos y los pacientes con
15 drepanocitosis, ya sea en el nivel de tendencia o en la significación estadística se priorizarán para el cribado en otros ensayos tales como la resistencia a la falciformación en condiciones de hipoxia y la exposición a los marcadores de adhesión tales como fosfatidilserina.

20 **Ejemplo 4. Biomarcadores de adhesión.**

El sello distintivo de la drepanocitosis es la “crisis de células falciformes” causada por la vasooclusión de pequeños vasos de sangre que llevan a lesiones isquémicas y a dolor grave. Una serie de factores conspiran hacia la
25 vasooclusión: la elevada rigidez y adhesión de los GR falciformes los hace más probables de adherirse a los GB en circulación y al endotelio vascular; la elevada arginasa de la hemólisis agota la arginina en plasma libre necesaria para generar el óxido nítrico (NO), lo que afecta a la
30 vasodilatación. Las crisis de células falciforme son la razón principal de que los pacientes buscan atención médica, y pueden ser potencialmente mortales, ya que pueden

ocurrir en cualquier órgano y durar varios días. Las crisis en la vasculatura pulmonar se manifiestan como el "síndrome torácico agudo"; las del cerebro pueden causar ictus o infartos cerebrales "silenciosos"; las del hueso pueden llevar a la osteonecrosis; y las crisis en cualquier parte pueden llevar a un daño e insuficiencia en casi cualquier órgano. La falciformación lleva a la alteración física y a un elevado recambio de la membrana de los eritrocitos, una elevada rigidez celular, deshidratación celular mediante la pérdida de potasio, y elevada adhesión de los GR mediante la externalización de la fosfatidilserina. La adhesión de los glóbulos rojos a los leucocitos y a las células endoteliales vasculares, mediada por una elevada exposición de la fosfatidilserina, está entre los mecanismos de vasooclusión en la drepanocitosis, y la medición de la exposición de la fosfatidilserina se correlaciona bien con otros ensayos de adhesión tales como la adhesión de los eritrocitos a las células epiteliales de la vena umbilical humana.

La exposición de la fosfatidilserina se medirá mediante la unión de Annexina V conjugada con la sonda fluorescente Alexa 488 (Life Technologies), bien en sangre de pacientes con drepanocitosis no tratados (aprobación del IRB, Hospital pediátrico de Boston), sangre de donantes de control sanos (Research Blood Components) en condiciones sin tratamiento o cuando se tratan con un estímulo relevante para la patología que se sabe que provoca la exposición de la fosfatidilserina tal como hipoxia o el ionóforo de calcio 4-br A23187 (Millipore Sigma). La capacidad de los tratamientos de aminoácidos a múltiples de los niveles basales hallados en la HMDB (Base de datos de metaboloma humano (Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al.,

HMDB: the Human Metabolome Database. Nucleic Acids Res. Enero de 2007;35(Número de la base de datos):D521-6.

17202168)) para modificar la exposición de la fosfatidilserina se observará en estas condiciones. Los aminoácidos individuales o las combinaciones capaces de reducir la exposición del marcador de adhesión fosfatidilserina serán posibles agentes terapéuticos para la reducción de la vasooclusión.

Ejemplo 5. Resistencia de los eritrocitos a la falciformación.

En condiciones de hipoxia, tales como en tejidos periféricos, o durante la anemia, los eritrocitos de la drepanocitosis cambian su morfología a la característica forma de "haz" debido a la polimerización de hemoglobina falciforme (HbS). Esto aumenta la rigidez celular y contribuye a la vasooclusión (Du et al. 2015). Los posibles tratamientos que proporcionan resistencia a la falciformación bien reduciendo la proporción de células que falciforman en hipoxia tal como se ha demostrado para la hidroxiaurea, o bien mediante el aumento del tiempo que lleva a las células la falciformación, podrían reducir la patología de la vasooclusión.

Los aminoácidos únicos y sus combinaciones en múltiples de los niveles basales hallados en la HMDB (Base de datos de metaboloma humano (Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al., HMDB: the Human Metabolome Database. Nucleic Acids Res. Enero de 2007;35(Número de la base de datos):D521-6. 17202168)) se probarán para su capacidad para proporcionar muestras de sangre completa de pacientes con drepanocitosis diluidas en el tampón apropiado con resistencia a la falciformación en incubación en una mezcla hipóxica (O₂ al 2 %, CO₂ al 5 %, equilibrio de N₂, Middlesex Gasses &

Technologies). Se obtendrán imágenes de las muestras en una microplaca de fluorescencia negra de 96 pocillos con parte inferior óptica (Thermo Fisher) durante un trascurso temporal en un microscopio confocal ImageExpress Micro
5 (Molecular Devices) y el porcentaje de células falciformes se identificará en cada punto temporal. Los aminoácidos o las combinaciones que proporcionan resistencia a la falciformación se considerarán para la inclusión en la composición frente a un conjunto de evidencias para estos
10 aminoácidos.

Ejemplo 6. Flujo de entrada de calcio de eritrocitos.

Los eritrocitos falciformes se describen como que tiene una fuga persistente de calcio, agravada por la hipoxia y la falciformación, lo que da como resultado la
15 exposición de marcadores de adhesión como la fosfatidilserina y contribuye a la patología de la enfermedad.

El flujo de entrada de calcio en las células falciformes se medirá cargando previamente la sangre
20 completa del paciente con drepanocitosis con la sonda de calcio intracelular Fluo-4 AM (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los aminoácidos únicos y sus combinaciones en múltiples de los niveles basales hallados en la HMDB (Base de datos de
25 metaboloma humano (Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al., HMDB: the Human Metabolome Database. Nucleic Acids Res. Enero de 2007;35(Número de la base de datos):D521-6. 17202168)) se probarán para su capacidad para proporcionar muestras de sangre completa de pacientes con drepanocitosis
30 diluidas en el tampón apropiado con resistencia al flujo de entrada de calcio en incubación en una mezcla hipóxica (O_2 al 2 %, CO_2 al 5 %, equilibrio de N_2 , Middlesex Gasses &

Technologies). Se obtendrán imágenes de las muestras en una microplaca de fluorescencia negra de 96 pocillos con la parte inferior óptica (Thermo Fisher) durante un trascurso de tiempo en un microscopio confocal ImageExpress Micro
5 (Molecular Devices) y el flujo de entrada de calcio se medirá observando la intensidad de fluorescencia con excitación=488 nm emisión=530 nm de cualquiera de estos eritrocitos con fenotipo falciforme o todas las células.

Ejemplo 7. Modelo de anemia de células falciformes en ratón

10 Berkeley

Se han desarrollado varios modelos de ratones transgénicos para examinar la patología de la naturaleza de los sistemas y el tratamiento de la drepanocitosis. Uno de estos modelos, llamado el ratón de Berkeley (BERK) se
15 desarrolló para expresar exclusivamente cadenas de hemoglobina humana, incluyendo la variante de hemoglobina falciforme (HbS), que lleva a la anemia de células falciformes en estos ratones (Paszty et al, 1997. Science). El modelo BERK aproxima bien muchos aspectos diferentes de
20 la enfermedad, incluyendo: anemia, reticulocitosis, células falciformes irreversibles, elevado recambio de glóbulos rojos, y patología de múltiples órganos (de Jong K et al, 2001. Blood).

Las combinaciones de aminoácidos a múltiples de los
25 niveles basales hallados en la HMDB (Base de datos de metaboloma humano (Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al., HMDB: the Human Metabolome Database. Nucleic Acids Res. Enero de 2007;35(Número de la base de datos):D521-6. 17202168)) se probarán contra placebo y múltiples niveles
30 de L-glutamina para su efecto terapéutico en los sistemas en el modelo de ratón BERK. Los animales recibirán por una sonda BID durante 4 semanas uno de los seis tipos de

tratamiento: (1) vehículo, (2) L-glutamina a baja dosis, (3) L-glutamina a alta dosis, (4) composición a baja dosis que consiste en L R Q NAC G Car H K V, (5) composición a alta dosis que consiste en L R Q NAC G Car H K V o (6) composición a alta dosis que consiste en L R Q NAC. Se analizarán las extracciones de sangre semanales de la punción de la vena de la cola para determinar los parámetros hematológicos (hemograma completo), que incluyen, entre otros, hematocrito, hemoglobina, volumen de eritrocitos, recuento de reticulocitos, recuento de leucocitos y recuento de plaquetas. Las extracciones de sangre también se analizarán para perfiles de aminoácido de plasma y GR, paneles de citocina, ROS, exposición a PS y otras células o marcadores moleculares relevantes. La biotinilación de glóbulos rojos antes de las extracciones de sangre y el análisis por citometría de flujo permitirán la cuantificación del recambio de glóbulos rojos. La histopatología permitirá la comparación de daño a los órganos en grupos de control y de tratamiento. Las combinaciones de aminoácidos que mejoran los parámetros hematológicos, la salud y el recambio de los eritrocitos y limitan el daño de órganos proporcionarán soporte para terapia en la anemia de células falciformes.

Ejemplo 8. Estudios de deformabilidad de GR en un modelo de hemólisis inducido ex vivo con pretratamiento de aminoácidos

La sangre completa de donantes afroamericanos y/o hispanicos se obtuvo de Research Blood Components, LLC basándose en los siguientes criterios de selección de donantes: Edad adulta (entre 18 y 50 años), IMC normal (<30) y ausencia de otras afecciones clínicas confusas. La sangre

completa de donantes con SCD se obtuvo de BioIVT basándose en los siguientes criterios de selección de donantes: Pacientes con genotipos HbSS, HbSC, HbS/ β^0 y un intervalo de al menos 1-2 meses desde la última transfusión de sangre. La sangre completa se envió en hielo el mismo día que la extracción de sangre. Tras la recepción la muestra de sangre se dividió en alícuotas y se almacenó en el refrigerador hasta su uso para estudios.

Las mediciones de deformabilidad de los GR se llevó a cabo con el analizador Laser Optical Rotational Red Cell Analyzer (LORRCA) de RR Mechatronics en un ambiente de temperatura controlada (37°C). En resumen, una capa uniforme de GR suspendidos en polivinilpirrolidona (PVP) se somete a un gradiente de tensión de cizallamiento (0.3 a 30 Pa) a través de dos cilindros concéntricos y los cambios resultantes en la forma o deformabilidad de los GR se miden mediante un patrón de difracción de rayo láser. Las imágenes capturadas de la forma de los GR en respuesta al aumento de la tensión de cizallamiento se analizan después por el programa LORRCA para calcular el índice de elongación (IE).

Los GR sanos tienen una mayor deformabilidad ≥ 0.5 de IE y los GR de SCD tienen unos valores de deformabilidad o IE más bajos tal como se estudia por ectacitometría con LORRCA en el campo. Se ha sugerido en las referencias previas que los cambios a $\frac{1}{2}$ de tensión de cizallamiento con $IE_{\text{máx}} \leq 1.69$ Pa indican cambio en la flexibilidad de la membrana de los GR y a una tensión de cizallamiento de ≥ 3.0 Pa indican impacto sobre la proporción de superficie celular/volumen de los GR, la viscosidad intracelular junto con la flexibilidad de la membrana (Renoux C, et al, Sci Rep. 1 de Mayo de 2019;9(1):6771). El modelo de hemólisis inducida en la presente divulgación implica el uso de hidróperóxido de terc-

butilo (TBHP) para reducir la IE de los GR. El TBHP ha demostrado que permeabiliza la membrana, oxida las células, induce la proteólisis, inhibe actividades enzimáticas e induce la hemólisis, simulando así la patología de la SCD
5 (Roy A, et al, Pathophysiology. abril de 2012;19(2):137-48 y Runge-Morris M, et al, Chem Res Toxicol. marzo-abril de 1989;2(2):76-83).

El estudio de hemólisis ex vivo desvelado en el presente documento implica el tratamiento durante la noche de la
10 sangre completa con vehículo como un control y aminoácidos específicos seguido de una rápida oxidación (5 minutos) con TBHP. El método para la oxidación de sangre completa con hidroperóxido de terc-butilo se ha usado en las referencias anteriores ((Diederich L, et al, Front Physiol. 11 de mayo
15 de 2018;9:332). La deformabilidad de los GR o los cambios de forma se miden después con ectacitometría por LORRCA.

Las alícuotas de sangre completa almacenadas en el frigorífico se llevaron a temperatura ambiente mientras se agitaban suavemente en un balancín a baja velocidad durante
20 una hora para asegurar una suspensión gradual y uniforme de los glóbulos rojos antes de las mediciones de deformabilidad. El control de vehículo usado en el estudio fue vehículo de fosfato de Dulbecco a 1X y los aminoácidos desvelados en el presente documento se añadieron (a una concentración final
25 de 10X o 2.5 mM tal como se indica) a las correspondientes condiciones de tratamiento de vehículo y aminoácidos. Las muestras se incubaron después toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se tomaron 25 µl de sangre completa de cada condición de tratamiento y se añadieron a 5 ml de solución
30 viscosa Elon ISO de RR Mechatronics. La muestra se invirtió de 15-20 veces para asegurar el correcto mezclado de los GR tratados con la solución Elon ISO seguido por una carga de

la muestra en LORRCA y la captura de la deformabilidad de los GR o las mediciones de la forma sobre el gradiente de cizallamiento aplicado. Los tratamientos de sangre completa restantes se devolvieron a la incubadora (37 ° C) hasta que
5 las mediciones de deformabilidad se completaron para todos los tratamientos. A las restantes muestras de tratamiento de sangre completa, se le añadió solución de TBHP (5.0-6.0 M en Decane, Sigma) a una concentración final de 2.5 mM a partir de una solución madre de 100 mM preparada recientemente y se
10 incubaron adicionalmente durante 5 minutos a 37 °C. Se retiraron inmediatamente 25 µl de esta muestra tratada con TBHP al final de la incubación de los 5 minutos y se añadieron a la solución Elon ISO para la medición de la deformabilidad de los GR después de la oxidación. En las Tablas 13-15 se
15 incluyen mediciones de IE a una tensión de cizallamiento de $\frac{1}{2}$ de IE_{máx} de 1.69 Pa y una tensión de cizallamiento de IE_{máx} de 30 Pa de estos estudios y la **Fig. 1** captura mediciones de IE para todos los puntos de tensión por cizallamiento para las condiciones de tratamiento indicadas.

20

Resultados

Medición de la deformabilidad de los GR o índice de elongación (IE) en el modelo de hemólisis ex vivo

La **Fig. 1** muestra cambios en la deformabilidad de los
25 GR sanos del donante sano 1 con y sin oxidación por TBHP de la sangre completa para los pretratamientos indicados con aminoácidos específicos desvelados en el presente documento o vehículo de DPBS. Las mediciones de deformabilidad de los GR se muestran en el eje Y en términos de IE y la tensión de cizallamiento aplicada (Pa) se muestra en el eje X. La
30 medición del IE para cada tensión por cizallamiento es una media de 50 mediciones. Las líneas sólidas representan los

pretratamientos durante la noche de la sangre completa sin oxidación por TBHP y las líneas punteadas representan tras la oxidación por TBHP.

La Tabla 13 captura las mediciones de deformabilidad de los GR (IE) a una tensión por cizallamiento semimáxima (1.69 Pa) y una tensión por cizallamiento máxima (30 Pa) de la **Fig. 1**. En la Tabla 13 se muestran dos múltiplos de variación diferentes. El múltiplo de variación del IE con hidroperóxido de terc-butilo muestra diferencias en el IE con y sin oxidación por TBHP para cada grupo de pretratamiento. La deformabilidad de los GR del vehículo de control a una tensión por cizallamiento de $\frac{1}{2}$ IE_{máx} (1.69 Pa) se reduce en 4.7 veces cuando se trata con TBHP y a IE_{máx} (30 Pa) se reduce en 2.0 veces. El múltiplo de variación en el grupo de pretratamiento de RNacCitQCar tenía respectivamente 2.9 veces y 1.5 veces de reducción en el IE de los GR con oxidación por TBHP para ambos puntos de tensión por cizallamiento. El grupo de pretratamiento de RNacCitQCarLHKVS tuvo un múltiplo de variación más bajo con oxidación por TBHP de 1.8 veces y 1.2 veces para los dos puntos de tensión por cizallamiento. El múltiplo de variación del IE en relación con el vehículo muestra diferencias en el IE en relación con el grupo de control de vehículo. El grupo de pretratamiento de RNacCitQCarLHKVS tiene la mejora más alta en $\frac{1}{2}$ IE_{máx} e IE_{máx} sobre el grupo de vehículo para la oxidación por TBHP en 2.6 y 1.9 veces, respectivamente, seguido por el grupo de RNacCitQCar. Los resultados de la **Fig. 1** y de la Tabla 13 sugieren un menor IE con la oxidación por TBHP para todas las condiciones de pretratamiento con el IE más bajo para el vehículo, un mayor IE para el RNacCitQCar y el IE más alto para RNacCitQCarLHKVS, lo que sugiere el beneficio de estas composiciones de aminoácido en la

minimización de la pérdida de la deformabilidad o el IE tras el daño oxidativo y hemolítico a los GR.

Los resultados de la Tabla 14 muestran la deformabilidad para tratamientos con un único aminoácido tras la oxidación por TBHP en sangre completa sana del donante sano 2. El IE para los tratamientos con un único aminoácido R, Cit, Nac, Q, Car sobre un vehículo de control es mayor que el vehículo tanto para las mediciones de $\frac{1}{2}$ IE_{máx} como para las de IE_{máx}. El grupo de tratamiento con Q fue el menos eficaz y RNacCitQCarLHKVS fue más eficaz entre todos los grupos de tratamiento tal como se muestra tanto por las mediciones del IE individual para $\frac{1}{2}$ IE_{máx}, IE_{máx} y el múltiplo de variación o la mejora del IE en relación con el control del vehículo. Adicionalmente, ambos donantes sanos 1 y 2 mostraron el IE más alto con la oxidación por TBHP para los grupos de pretratamiento de RNacCitQCarLHKVS basados en las Tablas 13 y 14. Los resultados de la Tabla 16 muestran adicionalmente el efecto de RNacCit en sangre completa del donante sano 2. El IE de los GR pretratados con RNacCit muestra una deformabilidad 1.8 veces mejor que el vehículo en la tensión por cizallamiento de $\frac{1}{2}$ IE_{máx} y aproximadamente 1.5 veces mejor en el IE_{máx} en respuesta a la oxidación por TBHP.

Los resultados de la Tabla 15 muestran un aumento lineal en la deformabilidad o el IE en los GR de un donante con SCD cuando se pretratan ex vivo con dosis en aumento de aminoácidos RNacCitQCarLHKVS seguido por una rápida oxidación por TBHP. El múltiplo de variación en la deformabilidad de los GR o IE muestra respuesta a la dosis para los pretratamientos de RNacCitQCarLHKVS a 5X, 10X y 20X en relación con el control del vehículo con el múltiplo de variación más alto de 5.3 veces observado para el pretratamiento a 20X.

Los resultados combinados de las Tablas 13-15 y de la **Fig. 1** demuestran el beneficio de las composiciones de aminoácidos específicas desveladas en el presente documento en la reducción de la pérdida de deformabilidad o de la forma de los GR tal como se mide mediante el IE en respuesta al daño de la oxidación, la proteólisis y la hemólisis. La reducción de la hemólisis podría minimizar potencialmente las crisis de dolor vasooclusivas y el daño orgánico en pacientes con drepanocitosis.

Tabla 13. Índice de elongación (IE) y múltiplo de variación de GR con oxidación por TBHP de sangre completa sana (donante sano 1) pretratada con aminoácidos en relación con el vehículo

Pretratamiento (aminoácidos a 10X / Nac, Cit, Car a 2.5 mM)	Adición de TBHP (2.5 mM)	Índice de elongación (IE)		Múltiplo de variación de IE con TBHP		Múltiplo de variación de IE en relación con vehículo	
		$\frac{1}{2}$ IE _{máx} (1.69 Pa)	IE _{máx} (30 Pa)	$\frac{1}{2}$ IE _{máx} (1.69 Pa)	IE _{máx} (30 Pa)	$\frac{1}{2}$ IE _{máx} (1.69 Pa)	IE _{máx} (30 Pa)
Vehículo	-	0.336	0.520	4.67	2.03	1.00	1.00
	+	0.072	0.255			1.00	1.00
RNacCitQCar	-	0.306	0.545	2.85	1.47	0.91	1.04
	+	0.107	0.370			1.48	1.45
RNacCitQCarLHKV S	-	0.336	0.561	1.76	1.16	1.00	1.07
	+	0.190	0.482			2.63	1.89

Tabla 14. Índice de elongación (IE) y múltiplo de variación de GR con oxidación por TBHP de sangre completa sana (donante sano 2) pretratada con aminoácidos en relación con el vehículo

Pretratamiento (aminoácidos a 10X / Nac, Cit, Car a 2.5 mM) + TBHP 2.5 mM	Índice de elongación (IE)		Múltiplo de variación de IE en relación con vehículo	
	$\frac{1}{2}$ IE _{máx} (1.69 Pa)	IE _{máx} (30 Pa)	$\frac{1}{2}$ IE _{máx} (1.69 Pa)	IE _{máx} (30 Pa)
R	0.057	0.251	1.35	2.14
Nac (2.5 mM)	0.056	0.245	1.33	2.09
Cit (2.5 mM)	0.053	0.255	1.26	2.17
Q	0.033	0.181	0.78	1.54
Car (2.5 mM)	0.048	0.210	1.14	1.79
RNacCitQCar	0.047	0.222	1.12	1.89
RNacCitQCarLHKVS	0.066	0.302	1.57	2.58
Vehículo	0.042	0.117	1.00	1.00

5

Tabla 15. Índice de elongación (IE) de GR con oxidación por TBHP de sangre completa con drepanocitosis con diferentes dosis de aminoácidos RNacCitQCarLHKVS

Pretratamiento con RNacCitQCarLHKVS (aminoácidos a 10X / Nac, Cit y Car correspondientes a 2.5 mM) + TBHP 2.5 mM	Índice de elongación IE _{máx} (30 Pa)	Múltiplo de variación de IE en relación con vehículo
Vehículo o 0X	0.014	1.00
5X	0.024	1.71
10X	0.061	4.35
20X	0.074	5.28

10

Tabla 16. Índice de elongación (IE) y múltiplo de variación de GR con oxidación por TBHP de sangre completa sana (donante sano 2) pretratada con aminoácidos en relación con el vehículo

Pretratamiento (aminoácidos a 10X / Nac, Cit, Car a 2.5 mM) + TBHP 2.5 mM	Índice de elongación (IE)		Múltiplo de variación de IE en relación con vehículo	
	$\frac{1}{2}$ IE _{máx} (1.69 Pa)	IE _{máx} (30 Pa)	$\frac{1}{2}$ IE _{máx} (1.69 Pa)	IE _{máx} (30 Pa)
R	0.087	0.308	1.02	1.00
Nac (2.5 mM)	0.096	0.337	1.13	1.10
Cit (2.5 mM)	0.095	0.327	1.11	1.06
RNacCit	0.154	0.452	1.81	1.47
Vehículo	0.085	0.306	1.00	1.00

5

Ejemplo 9. Cribado de células endoteliales

La disfunción vascular en SCD se puede manifestar en la expresión de marcadores de adhesión de células endoteliales vasculares (VEC), citocinas inflamatorias y síntesis reducida de óxido nítrico (NO) y función endotelial dependiente de NO. Esta patología multifacética puede contribuir a una perfusión de sangre reducida y a un aumento de la probabilidad de eventos vasooclusivos agudos o daño progresivo a los órganos.

Se empleó un modelo de VEC para evaluar la capacidad de los aminoácidos para influir en aspectos de la disfunción vascular en la SCD. El tratamiento de TNFa del donante sano HLMVEC imita el estado patológico de SCD e induce la expresión de los marcadores de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 y la secreción de la citocina proinflamatoria IL-6. Se establece que los niveles de ICAM-1, VCAM-1 e IL-6 pueden contribuir a la patología de la SCD y se correlaciona con la incidencia y la gravedad de las

complicaciones en pacientes con SCD. El modelo VEC buscó probar la capacidad de los aminoácidos para reducir el fenotipo de la enfermedad inducida por TNFa al reducir la expresión de marcadores de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) y
5 citocinas inflamatorias (IL-6) mientras promueve la salud y la viabilidad de VEC.

Se sembraron células endoteliales microvasculares de pulmón humano primario (HLMVEC; Lonza) a razón de 6,000 células por pocillo en medio basal de crecimiento de
10 células endoteliales 2 (Lonza) complementado con suero bovino fetal (FBS; Lonza), EGF humano (Lonza), VEGF humano (Lonza), Factor de crecimiento similar a la insulina R3-1 (Lonza), ácido ascórbico (Lonza), hidrocortisona (Lonza), FGF-beta humano (Lonza) y gentamicina/anfotericina-b
15 (Lonza) en una placa de 96 pocillos (Thermo Fisher). Las células se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente, después se incubaron toda la noche a 37 °C/CO₂ al 5 %.

Tras la incubación toda la noche, las células se
20 lavaron una vez con 150 µl de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS; Gibco) y después se trataron con medio basal endotelial MCB-131 (aminoácido, glucosa, piruvato de sodio y rojo fenol libre; US Biologicals) que contiene una concentración de aminoácido personalizada
25 definida basada en las concentraciones fisiológicas en sangre de pacientes con SCD (recapitulando así los desequilibrios metabólicos observados, como el agotamiento de ciertos aminoácidos esenciales, como la arginina y el aspartato, y el enriquecimiento de ciertos aminoácidos no
30 esenciales, como el glutamato y la asparagina), FBS dializado (Hyclone), EGF humano (Lonza), VEGF humano (Lonza), factor de crecimiento de tipo insulina R3-1

(Lonza), ácido ascórbico (Lonza), hidrocortisona (Lonza), FGF-beta humano (Lonza) y gentamicina/anfotericina-b (Lonza), glucosa, HEPES 10 mM, piruvato de sodio y bicarbonato de sodio suplementado con uno de lo siguiente:

- 5 a. PBS (control de vehículo),
- b. 0.5 ng/ml de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y PBS, o;
- c. 0.5 ng/ml de TNF α y tratamientos de aminoácidos a concentraciones fisiológicas medias de 20X en
- 10 plasma basándose en valores publicados en la base de datos de metaboloma humana (HMDB) en PBS.

Después de 24 horas de tratamiento, las células se lavaron una vez con 150 μ l de DPBS (Gibco), después se fijaron con paraformaldehído al 4 %. Tras la fijación, las

15 células se tiñeron con diluciones de anticuerpos primarios anti-ICAM-1 [MEM-111] (anti-IgG2a humana en ratón; abcam) y anti-VCAM1 [1.4C3] (anti-IgG1, κ humana en ratón; abcam) a 1000X y 100X, respectivamente. A continuación, las células se tiñeron con anticuerpo secundario adsorbido cruzado

20 anti-IgG2 de ratón en cabra, Alexa Fluor 594 (Invitrogen) y anticuerpo secundario adsorbido cruzado anti-IgG1 de ratón en cabra, Alexa Fluor 647 (Invitrogen). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 3342 (Life Technologies).

La unión del anticuerpo se detectó mediante

25 microscopía de fluorescencia usando un generador de imágenes de alto contenido (Molecular Devices). Las imágenes se analizaron usando el programa informático MetaXpress 6 para determinar la intensidad integrada por célula para cada longitud de onda que se corresponde con

30 ICAM-1 o VCAM-1.

Los sobrenadantes se analizaron para las concentraciones de IL-6 usando un kit de citocinas humanas

FirePlex-HT Panel 1 (abcam) de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante. Se tomaron imágenes de las partículas en un generador de imágenes de alto contenido (Molecular Devices) y los resultados se

5 interpolaron a partir de una curva estándar con el programa informático FirePlex Analysis Workbench (abcam) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

10 **Tabla 17. Niveles reducidos de composiciones de aminoácidos específicos de IL6 secretada en HLMVEC tratado con TNFa**

Suplemento de aminoácido [Conc.]*	IL-6 secretada		Meta-rango
	Median a	p-Valor	
Arg [20x]	-0.224	0.0569	19
Car [5mM]	-0.022	0.3751	24
Cit [5mM]	-0.270	0.0754	16
CitNac [5mM]	-0.321	0.1961	15
Gln [20x]	0.043	0.7304	28
Gly [20x]	-0.010	0.9533	26
His [20x]	-0.198	0.6232	22
LIV [20x]	-0.227	0.2337	17
LRQNac [20x/5mM]	-0.346	0.0301	13
LRQNacCit [20x/5mM]	-0.332	0.0758	14
Leu [20x]	-0.491	0.0072	7
Lys [20x]	0.132	0.6119	29
Nac [5mM]	-0.497	0.0090	6
Orn [20x]	-0.378	0.4054	11
RCit [20x]	0.029	0.6405	27
RCitNac [20x/5mM]	-0.870	0.0313	1
RCitNacQCar [20x/5mM]	-0.831	0.0531	3
RCitNacQCarLHKVS [20x/5mM]	-0.465	0.0461	9
RNac [20x/5mM]	-0.445	0.0911	10
RQNac [20x/5mM]	-0.770	0.0339	4
Ser [20x]	-0.153	0.4493	23
Trp [20x]	-0.357	0.0723	12
Val [20x]	-0.224	0.0553	18

Las HLMVEC tratadas con composiciones de aminoácidos que comprenden RCitNac o RCitNacQCar redujeron en gran medida la secreción de IL-6 de las células tratadas con TNF- α . RQNac también redujo la secreción de IL-6.

- 5 RCitNacQLHKVS redujo moderadamente los niveles secretados de IL-6.

10 **Tabla 18. Niveles reducidos de composiciones de aminoácidos específicos de intensidad integrada de células de ICAM-1 y VCAM-1 en HLMVEC tratados con TNFa**

Suplemento de aminoácido [Conc.]*	Intensidad integrada de células de ICAM-1		Intensidad integrada de células de VCAM-1		Meta-Rango
	Mediana	p-Valor	Mediana	p-Valor	
Arg [20x]	-0.046	0.9977	-0.001	0.7376	12.5
Car [5mM]	-0.013	0.5476	-0.017	0.5354	12.5
Cit [5mM]	-0.118	0.0150	-0.157	0.0018	8
CitNac [5mM]	-0.249	0.1532	-0.275	0.3477	4
Gln [20x]	0.237	0.0454	0.372	0.0159	29
Gly [20x]	-0.261	0.0375	-0.298	0.0434	3
His [20x]	0.084	0.0366	0.109	0.0461	18.5
LIV [20x]	0.172	0.1098	0.172	0.0904	25
LRQNac [20x/5mM]	0.142	0.2944	0.084	0.4009	20
LRQNacCit [20x/5mM]	0.089	0.3654	0.114	0.2541	20
Leu [20x]	0.086	0.0682	0.125	0.0627	20
Lys [20x]	0.064	0.7900	0.025	0.8225	15.5
Nac [5mM]	-0.222	0.1615	-0.315	0.1000	4
Orn [20x]	-0.197	0.0419	-0.196	0.0809	6.5
RCit [20x]	0.089	0.2309	0.158	0.0854	22
RCitNac [20x/5mM]	-0.337	0.0019	-0.422	<0.0001	1
RCitNacQCar [20x/5mM]	0.056	0.3256	0.045	0.3334	15.5
RCitNacQCarLHKVS [20x/5mM]	0.002	0.5616	-0.036	0.9955	12
RNac [20x/5mM]	-0.192	0.0461	-0.244	0.0664	6.5
RQNac [20x/5mM]	0.235	0.2581	0.228	0.2878	27
Ser [20x]	0.076	0.2756	0.139	0.0378	19
Trp [20x]	0.171	0.1249	0.162	0.2243	24

Val [20x]	0.167	0.2593	0.315	0.0118	25.5
-----------	-------	--------	-------	--------	------

* [20x] Se corresponde con los valores de HMDB

RCitNac redujo en gran medida los niveles de expresión de ICAM-1 inducidos por TNF- α en células HLMVEC. Gly, CitNac y Nac también redujeron los niveles de expresión de ICAM-1 en menor grado. Las células HLMVEC tratadas con RCitNacQCarLHKVS y RCitNacQCar redujeron moderadamente los niveles de expresión de ICAM-1 inducida por TNF- α . RCitNac, Nac, Gly y CitNac redujeron en gran medida la expresión de VCAM-1 en células HLMVEC. RCitNacQCarLHKVS, tuvo un efecto moderado sobre la expresión de VCAM-1 en estas células, al igual que Cit y Car.

Sumario de los resultados: Como se describe, un tratamiento ideal es aquel que aborda la patología multifactorial de la SCD representada por HLMVEC al reducir los fenotipos de la enfermedad (VCAM1, ICAM1, IL6). La capacidad de los aminoácidos individuales y las combinaciones para impactar simultáneamente estos fenotipos se midió mediante una puntuación de META-rango (Tablas 17 y 18). La puntuación de META-rango es una medida compuesta que considera el impacto óptimo en los 3 fenotipos (por ejemplo, disminución de VCAM1, ICAM1 e IL6) en el modelo HLMVEC. Un tratamiento de combinación o de aminoácidos óptimo (es decir, un tratamiento que tiene el efecto deseado en todas las medidas) tiene una puntuación más baja que un tratamiento subóptimo (es decir, el tratamiento tiene un efecto no deseado en todas las medidas). Según el META-rango, RCitNac fue el tratamiento óptimo, y las combinaciones RCitNacQCar y RCitNacQCarLHKVS se encontraban entre las condiciones óptimas de tratamiento.

Ejemplo 10. Evaluación de la farmacocinética de múltiples compuestos tras la administración de una dosis oral a ratas macho Sprague-Dawley

SUMARIO

5 Se realizó un análisis farmacocinético (PK) de las concentraciones plasmáticas de varias combinaciones de compuestos de aminoácidos administrados por sonda oral a ratas macho Sprague-Dawley. A cuatro animales se les administraron dosis de RCitNacQCarLHKVS, un artículo de
10 prueba que comprende diez componentes de aminoácidos: arginina, citrulina, N-acetilcisteína, glutamina, carnitina, leucina, histidina, lisina, valina y serina (Tabla 19). Los animales estuvieron en ayunas durante 2 horas antes de la administración de la dosis. Se tomaron
15 muestras de plasma inmediatamente antes de la dosis y 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 horas después de la dosis.

 El bioanálisis de las muestras de plasma recolectadas para determinar el contenido de aminoácidos se realizó en Axcella Health utilizando un método LC-MS (Sección 2.1).
20 Los datos bioanalíticos se analizaron mediante análisis no compartimental con Phoenix® WinNonLin® (v8.1).

 La mayoría de los compuestos dosificados como parte de RCitNacQCarLHKVS aumentaron en concentración después de la dosificación, alcanzando la concentración máxima entre 0.5
25 y 3 horas después de la dosis, con carnitina y N-acetilcisteína como las únicas excepciones. La carnitina aumentó de forma continua durante el transcurso de cinco horas, mientras que no se detectó N-acetilcisteína en el plasma. Se tabularon los parámetros PK, tal como $T_{\text{máx}}$, $C_{\text{máx}}$ y
30 ABC_{0-5h} .

METODOLOGÍA

Sumario de procedimientos de análisis de la muestra

Se utilizó un método LC/MS que utiliza cromatografía HILIC y espectrometría de masas de alta resolución para
 5 cuantificar aminoácidos en plasma de rata. Las muestras se prepararon mediante precipitación de proteínas y se enriquecieron con estándar interno de aminoácidos marcados de forma estable para cada analito. Se utilizaron
 estándares de calibración para la cuantificación absoluta y
 10 el rango lineal para cada analito fue generalmente de 10 a 2000 μM . Se utilizaron controles de calidad, enriquecidos con plasma de rata, para evaluar la precisión del método.

Análisis farmacocinético (PK)

Los PK de los componentes del artículo de prueba se
 15 determinaron a partir de datos de concentración en plasma-tiempo de ratas individuales empleando un enfoque no compartimental utilizando el programa informático Phoenix WinNonlin® (Versión 8.1). Se utilizaron tiempos nominales para calcular los parámetros toxicocinéticos. Se tabularon
 20 los parámetros farmacocinéticos tales como $T_{\text{máx}}$, $C_{\text{máx}}$ y $\text{ABC}_{0-5\text{h}}$, según fuese apropiado. Este programa analizó los datos usando métodos estándar descritos por Gibaldi y Perrier (véase M. Gibaldi y D. Perrier, Pharmacokinetics, 2^a edición, Nueva York: Marcel-Dekker, Inc.; 1982.).

25

Tabla 19. Composición de artículo de prueba

Componente de aminoácido	Dosis (mg/kg)
Arginina	617.3
Citrulina	411.6
N-Acetilcisteína	133.8
Glutamina	514.4
Carnitina	102.9
Leucina	308.7

Histidina	102.9
Lisina	154.3
Valina	102.9
Serina	257.2

RESULTADOS

Arginina

Las concentraciones iniciales de arginina variaron de 74.9 a 112 μM en todos los animales. Después de la dosificación la media de la concentración máxima de arginina ($C_{\text{máx}}$) en animales dosificados con RCitNacQCarLHKVS fue de 565 μM , teniendo lugar 0.5 – 2.0 horas después de la dosis. El $\text{ABC}_{0-5\text{h}}$ de arginina para los animales fue de 2210 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ en promedio.

10 Citrulina

Las concentraciones iniciales de citrulina variaron de 31.6 a 62.7 μM en todos los animales. Después de la dosificación la media de la concentración máxima de citrulina ($C_{\text{máx}}$) en animales dosificados con RCitNacQCarLHKVS fue de 583 μM , teniendo lugar 2.0 – 3.0 horas después de la dosis. El $\text{ABC}_{0-5\text{h}}$ de citrulina para los animales fue de 2090 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ en promedio.

Glutamina

Las concentraciones iniciales de glutamina variaron de 401 a 615 μM en todos los animales. Después de la dosificación la media de la concentración máxima de glutamina ($C_{\text{máx}}$) en animales dosificados con RCitNacQCarLHKVS fue de 605 μM , teniendo lugar 0.5 horas después de la dosis. El $\text{ABC}_{0-5\text{h}}$ de glutamina para los animales fue de 2370 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ en promedio.

CONCLUSIONES

Después de la dosificación del artículo de prueba RCitNacQCarLHKVS, las concentraciones plasmáticas de los

aminoácidos componentes tendieron a alcanzar el valor máximo entre 0.5 y 3.0 horas después de la dosis y disminuyeron con el tiempo.

Tabla 20.

Compuesto		$T_{\text{máx}}$ (h)	$C_{\text{máx}}$ (μM)	ABC_{0-5h} ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)
Arginina	Media	1.38	565	2210
	DT	0.750	42.7	191
Carnitina	Media	5.00	83.8	237
	DT	0.00	6.87	12.0
Citrulina	Media	2.50	583	2090
	DT	0.577	95.3	227
Glutamina	Media	0.500	605	2370
	DT	0.00	22.1	129
Histidina	Media	1.25	41.9	157
	DT	1.19	5.43	25.9
Leucina	Media	0.500	170	586
	DT	0.00	23.0	54.6
Lisina	Media	1.00	337	1350
	DT	0.707	26.9	72.5
Serina	Media	2.25	285	1030
	DT	1.50	58.3	141
Valina	Media	1.00	126	463
	DT	0.707	14.6	40.3

5 Ejemplo 11. Monitoreo de homogeneidad en tiempo real usando NIR - Combinaciones adicionales y mezcla de mezclador en V

La **FIG. 2A** muestra el enfoque dependiente del tiempo para mezclar la uniformidad durante el procesamiento de una tercera combinación ilustrativa adicional de entidades de aminoácidos (la combinación ilustrativa de la Tabla 3) usando un mezclador en V. Se tomaron muestras para generar espectros NIR cada cuatro minutos. El colapso de los espectros NIR en puntos de tiempo tardíos indica que la combinación ha logrado uniformidad de mezcla. La **FIG. 2B** representa el promedio de cuatro saquitos tubulares independientes seleccionados al azar y los datos de recuperación de aminoácidos se expresan como un 90-110 por ciento del contenido teórico. Los datos, cuando se toman en

conjunto, indican que se ha logrado la uniformidad de mezcla y contenido.

Estos experimentos demuestran que los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para lograr uniformidad de mezcla y contenido para combinaciones adicionales de entidades de aminoácidos y que una variedad de técnicas de combinación, incluida la combinación con mezclador en V, son adecuadas para lograr la uniformidad.

Ejemplo 12. Tratamiento de pacientes con drepanocitosis con una composición de aminoácido

El estudio descrito en el presente documento presenta la administración de una composición que incluye aminoácidos para tratar pacientes con drepanocitosis (SCD). El objetivo de este estudio es evaluar la seguridad alimentaria y la tolerabilidad de la composición durante 12 semanas en sujetos con drepanocitosis (SCD).

La seguridad y la tolerabilidad serán evaluadas por: eventos adversos clínicos notificados; exámenes físicos, constantes vitales y ECG; y pruebas de laboratorio clínico que incluyen cambios en hematología, química, aminoácidos plasmáticos y otros marcadores funcionales/de inflamación y adhesión vascular. Los cambios estructurales y funcionales se evaluarán mediante: resonancia magnética multiparamétrica para la perfusión cerebral y renal; la métrica de caminata de 6 minutos; y oximetría de pulso. Se evaluarán aproximadamente 48 sujetos masculinos y femeninos ≥ 12 años con un diagnóstico previo confirmado de SCD.

Se prevé que el estudio se realice en dos partes (**FIG. 3**). Parte I: El estudio se iniciará en aproximadamente 24 sujetos adultos (≥ 18 años) con SCD como un estudio aleatorizado controlado con placebo de doble ciego (2:1 de activo:placebo) durante un máximo de 12 semanas de

administración de la composición a 26.3 g BID (52.6 g/día). Basándose en el seguimiento continuo de la tolerabilidad y la seguridad, las cantidades y/o el régimen de la composición se pueden ajustar a la baja. Parte II: A la

5 espera de los resultados del análisis intermedio después de la semana 4 y/o los resultados del final del estudio de la semana 12 de la Parte I, la Parte II puede iniciarse posteriormente en una cohorte separada de aproximadamente

ocho adultos adicionales (≥ 18 años) y dieciséis (16)

10 sujetos adolescentes (12-17 años). La cantidad prevista de la composición para sujetos adultos en la Parte II es 17.4 g BID (34.8 g/día); para los sujetos adolescentes, las cantidades se ajustarán en función de su peso corporal (PC): 26.3g BID si el PC > 50 kg y 17.4g BID si el PC ≤ 50 kg.

15 Las cantidades y/o el régimen de composición pueden ajustarse aún más en espera de los resultados de la Parte I. No habrá una sección de placebo separado en la Parte II.

Parte I y Parte II: Inicio (Día 1) hasta la semana 12: En la Parte I, la aleatorización debe ocurrir

20 aproximadamente 3-5 días antes de la visita del Día 1 y se basará en una proporción de 2:1 de activo:placebo. La composición del estudio asignada [composición de 26.3 g BID (52.6 g/día) o Placebo] se enviará al centro clínico tras la aleatorización de cada sujeto. Una vez que se haya

25 realizado la aleatorización, los sujetos se presentarán en el sitio del estudio el día 1 para sus evaluaciones de referencia. En la Parte II, como no hay una sección de placebo separado, todos los sujetos recibirán la composición como una cantidad fija en adultos (por ejemplo,

30 17.4 g BID) o cantidades ajustadas al peso corporal en sujetos adolescentes (por ejemplo, 26 g BID si el PC > 50 kg y 17.4 g BID si el PC ≤ 50 kg).

La composición está compuesta de aminoácidos. El producto placebo es un excipiente adaptado a la composición. Las composiciones de estudio se proporcionan como polvo seco en saquitos tubulares individuales. Cada saquito tubular contiene ~8.76 g de aminoácidos por saquito tubular. El número prescrito de saquitos tubulares para cada administración [por ejemplo, ya sea 2, 3 o 4 saquitos tubulares BID] que luego se mezclan en ~ 6 oz (~ 180 ml) de agua y luego se consumen inmediatamente dos veces al día aproximadamente 30 minutos (es decir, 30 ± 5 minutos) antes de las comidas (por ejemplo, antes del desayuno y cena o antes del almuerzo y la cena, si el desayuno no forma parte habitual de su rutina diaria) durante toda la duración del estudio.

15

SUMARIO DE LOS EJEMPLOS

La drepanocitosis es compleja y está promovida por multitud de mecanismos únicos. Mantener la salud y el funcionamiento de la sangre requiere la coordinación de muchos procesos biológicos, celulares y moleculares. Tal como se demuestra en los ejemplos en el presente documento, las composiciones de aminoácidos desveladas en la presente solicitud (incluyendo LRQNaCHKVSCitCar, RCitNacQCar y RCitNac) fueron capaces de [1] mitigar las citocinas inflamatorias en células endoteliales vasculares, [2] reducir la expresión de moléculas de adhesión celular en células endoteliales vasculares humanas, y [3] proteger contra las agresiones a la deformabilidad de los glóbulos rojos humanos, mientras que las composiciones como Q, RCit y NAC solo pudieron influir en algunos, pero no en todos, los procesos importantes necesarios para mantener la salud de la sangre. De hecho, la glutamina (Q), que está aprobada

30

por la FDA para el tratamiento de la drepanocitosis, mostró efectos negativos o indeseables en ensayos particulares en el presente documento que se mitigan en combinaciones.

5 Si bien la invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a una realización preferida y varias realizaciones alternativas, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar varios cambios en la forma y los detalles sin apartarse del espíritu y
10 alcance de la invención.

Todas las referencias, patentes emitidas y solicitudes de patente citadas dentro del cuerpo de la presente memoria descriptiva, se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad, para todos los propósitos.

15 Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.