



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 045**

51 Int. Cl.:
A23L 1/305 (2006.01)
A61K 38/01 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06701213 .8**
96 Fecha de presentación : **16.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1838172**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.10.2007**

54 Título: **Nuevas composiciones neutracéuticas.**

30 Prioridad: **18.01.2005 EP 05100271**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.05.2011

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

72 Inventor/es: **Wolfram, Swen y**
Loon van, Lucas Johannes Cornelis

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 358 045 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevas composiciones nutraceuticas.

La presente invención se refiere a una nueva composición nutraceutica.

5 La diabetes mellitus es una enfermedad crónica ampliamente extendida que hasta ahora no tiene cura. La incidencia y prevalencia de diabetes mellitus está creciendo exponencialmente, y se encuentra entre los trastornos metabólicos más habituales en países desarrollados y en desarrollo. La diabetes mellitus es una enfermedad compleja derivada de múltiples factores etiológicos, y caracterizada por un metabolismo alterado de los hidratos de carbono, proteínas y grasas, asociado con una deficiencia en la secreción de insulina y/o resistencia a la insulina. Esto da como resultado concentraciones elevadas de glucosa sérica en ayunas y postprandial, que conduce a complicaciones si no se trata. Hay dos categorías principales de la enfermedad, la diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM, T1 DM) y la diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM, T2DM). T1 DM = diabetes mellitus tipo 1. T2DM = diabetes mellitus tipo 2.

15 Las diabetes T1DM y T2DM están asociadas con hiperglucemia, hipercolesterolemia e hiperlipidemia. La falta absoluta de insulina y la insensibilidad a la insulina en T1DM y T2DM, respectivamente, conducen a una disminución en la utilización de la glucosa por el hígado, músculo y el tejido adiposo, y a un aumento en los niveles glucémicos. La hiperglucemia descontrolada está asociada con un aumento de la mortalidad prematura debido al mayor riesgo de enfermedades microvasculares y macrovasculares, incluyendo nefropatía, neuropatía, retinopatía, hipertensión, apoplejía y cardiopatía. Signos recientes mostraron que un control glucémico estricto es un factor principal en la prevención de estas complicaciones tanto en T1DM como T2DM. Por lo tanto, el control glucémico óptimo mediante fármacos o regímenes terapéuticos es un enfoque importante para el tratamiento de diabetes.

20 La terapia de T2DM implica inicialmente cambios dietéticos y de estilo de vida, y cuando estas medidas fracasan para mantener el control glucémico adecuado los pacientes son tratados con agentes hipoglucémicos orales y/o insulina exógena. Los actuales agentes farmacológicos orales para el tratamiento de T2DM incluyen aquellos que potencian la secreción de insulina (agentes de tipo sulfonilureas), aquellos que mejoran la acción de la insulina en el hígado (agentes biguanídicos), agentes que sensibilizan frente a la insulina (tiazolidindionas) y agentes que actúan para inhibir la captación de glucosa (inhibidores de α -glucosidasa). Sin embargo, los agentes actualmente disponibles generalmente fracasan a la hora de mantener un control glucémico adecuado a largo plazo, debido al deterioro progresivo de la hiperglucemia, que resulta de la pérdida progresiva de la función de las células pancreáticas. La proporción de pacientes capaces de mantener niveles objetivos de glucemia disminuye notablemente a lo largo del tiempo, necesitando la administración de agentes farmacológicos adicionales/alternativos. Además, los fármacos pueden tener efectos secundarios indeseados, y están asociados con tasas de fracaso primario y secundario elevadas. Finalmente, el uso de fármacos hipoglucémicos puede ser eficaz controlando los niveles de glucemia, pero puede que no prevengan todas las complicaciones de la diabetes. De este modo, los métodos actuales de tratamiento para todos los tipos de diabetes mellitus fracasan a la hora de lograr los ideales de normoglucemia y la prevención de las complicaciones diabéticas.

35 L.J.C. van Loon et al, Diabetes Care, Vol. 26, No. 3 March 2003, 625-630, describe el uso de una composición que comprende aminoácidos y proteína, composición la cuál triplicó la respuesta de la insulina tras la ingesta de hidratos de carbono. En este artículo, se usaron leucina y fenilalanina en esta composición en una relación de 1:1 (véase, por ejemplo, el párrafo "bebidas" en la página 626).

40 El documento WO 2004/022083 se refiere a una composición nutricional y terapéutica de un sensibilizador a la insulina y una fracción peptídica. Este documento describe el uso de una mezcla de aminoácidos para una respuesta elevada a la insulina. En la página 7, líneas 12-15, Ejemplos 1 y 4, se suplementan en cantidades iguales a los aminoácidos libres leucina y fenilalanina.

45 L.J.C. van Loon et al, Am. J. Clin Nutr. Vol. 72, 2000, 96-105 se refiere a respuestas a la insulina plasmática tras la ingestión de diferentes mezclas de aminoácidos o proteínas con hidrato de carbono. La Tabla 1 muestra que se usan en cantidades iguales leucina y fenilalanina.

L.J.C. van Loon et al, J. Nutr. Vol. 130, 2000, 2508-2513 describe la ingestión de hidrolizado de proteínas y mezclas de aminoácidos con hidratos de carbono para incrementar las respuestas a la insulina plasmática en hombres tras el ejercicio. En todos los métodos usados, están presentes la leucina y la fenilalanina.

50 El documento WO 2002/49636 describe el uso de lisina, leucina, cisteína, glicina y ácido glutámico como una composición antidiabética.

El documento WO 2004/056207 describe una composición que regula la glucemia, basándose en un hidrolizado de suero de leche.

55 Por lo tanto, aunque las terapias de elección en el tratamiento T1DM y T2DM se basan esencialmente en la administración de insulina y de fármacos hipoglucémicos orales, existe la necesidad de un suplemento nutricional seguro y eficaz con efectos secundarios mínimos para el tratamiento y prevención de diabetes. Muchos pacientes están interesados en terapias alternativas que podrían minimizar los efectos secundarios asociados con dosis elevadas de

fármacos, y producir efectos clínicos aditivos. Los pacientes con diabetes mellitus tienen un interés especial en el tratamiento considerado como "natural" con efectos antidiabéticos leves y sin efectos secundarios importantes, que se pueda usar como tratamiento adyuvante. T2DM es una enfermedad progresiva y crónica, que habitualmente no se reconoce hasta que se ha producido un daño significativo a las células pancreáticas responsables de la producción de insulina (células β de los islotes de Langerhans). Por lo tanto, existe un creciente interés en el desarrollo de un suplemento dietético que se puede usar para prevenir el daño de las células β , y de este modo la progresión de T2DM manifiesta, en personas en riesgo, especialmente en ancianos que tienen un riesgo elevado de desarrollar T2DM. La protección de las células β pancreáticas se puede lograr disminuyendo los niveles de glucemia y/o de lípidos, ya que la glucosa y los lípidos ejercen efectos dañinos sobre las células β . La reducción de los niveles de glucemia se puede lograr mediante diferentes mecanismos, por ejemplo potenciando la sensibilidad a la insulina y/o reduciendo la producción de glucosa hepática. La reducción de los niveles de lípidos en la sangre también se puede lograr vía diferentes mecanismos, por ejemplo potenciando la oxidación de los lípidos y/o el almacenamiento de lípidos. Otra estrategia posible para proteger las células β pancreáticas sería disminuir el estrés oxidativo. El estrés oxidativo también provoca daño de las células β , con la pérdida subsiguiente de secreción de insulina y la progresión a T2DM manifiesta.

Por lo tanto, T2DM es una enfermedad complicada que resulta de defectos coexistentes en múltiples sitios orgánicos: resistencia a la acción de la insulina en tejidos musculares y adiposos, secreción defectuosa de insulina pancreática, producción no restringida de glucosa hepática. Esos defectos a menudo están asociados con anomalías lipídicas y disfunción endotelial. Dadas las múltiples lesiones patofisiológicas en T2DM, la terapia de combinación es un enfoque atractivo para su tratamiento.

La presente invención se define mediante las reivindicaciones, y se refiere a nuevas composiciones nutracéuticas que comprenden hidrolizados de proteínas y leucina y un hidrato de carbono, en las que al menos 70% de los aminoácidos presentes es leucina. Las composiciones nutracéuticas que comprenden leucina también pueden comprender proteínas no hidrolizadas e hidratos de carbono como ingredientes activos para el tratamiento o prevención de diabetes mellitus, u otras afecciones asociadas con tolerancia alterada a la glucosa, tales como síndrome X y obesidad. En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de tales composiciones como un suplemento nutricional para el mencionado tratamiento o prevención, por ejemplo, como un aditivo a preparaciones multivitamínicas que comprenden vitaminas y minerales que son esenciales para el mantenimiento de la función metabólica normal pero que no se sintetizan en el cuerpo. En aún otro aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento de diabetes mellitus tanto de tipo 1 como 2, y para la prevención de T2DM en aquellos individuos con prediabetes, o tolerancia alterada a la glucosa (IGT) u obesidad, que comprende administrar a un sujeto que necesita de tal tratamiento leucina e hidrolizados de proteínas o proteínas no hidrolizadas y/o hidratos de carbono.

Las composiciones de la presente invención están destinadas particularmente para el tratamiento tanto de T1DM como de T2DM, y para la prevención de T2DM en aquellos individuos con prediabetes, o tolerancia alterada a la glucosa (IGT), u obesidad.

La presente invención se refiere a una composición que comprende leucina y un hidrolizado de proteínas y un hidrato de carbono, en la que al menos 70% de los aminoácidos presentes es leucina. El aminoácido leucina está presente en la composición o en los ingredientes que están destinados para uso según la presente invención en al menos 70% en peso, preferiblemente al menos 80% en peso, más preferiblemente al menos 90% en peso de los aminoácidos presentes, y están presentes menos de 30% en peso, preferiblemente menos de 20% en peso, más preferiblemente menos de 10% en peso de otros aminoácidos. Esta combinación de leucina y un hidrolizado de proteínas se usa ventajosamente para incrementar la insulina plasmática en sangre, preferiblemente para diabetes de tipo 2 o para prediabetes.

Sorprendentemente, se encuentra que este un aminoácido combinado con el hidrolizado se puede usar para diabetes de tipo 2 o prediabetes, preferiblemente para reducir las concentraciones de glucosa postprandial, o para incrementar la secreción de insulina postprandial en la sangre. sorprendentemente, se ha encontrado que, usando la combinación de leucina e hidrolizado, se obtienen resultados iguales o incluso mejores que, por ejemplo, la combinación de dos aminoácidos, tales como leucina y fenilalanina y un hidrolizado.

Las composiciones que comprenden una combinación de ingredientes activos, es decir, leucina e hidrolizados de proteínas o proteínas sin hidrolizar y/o hidratos de carbono, estimulan sinérgicamente la secreción de insulina e incrementan la eliminación de glucosa de tejidos diana sensibles a insulina, tales como tejido adiposo, músculo esquelético e hígado, y, de este modo, proporcionan efectos sinérgicos en el tratamiento de diabetes mellitus.

El término nutracéutico, como se usa aquí, representa la utilidad en el campo de aplicación tanto nutricional como farmacéutico. De este modo, las nuevas composiciones nutracéuticas pueden encontrar uso como suplemento para alimentos y bebidas, y como formulaciones farmacéuticas para aplicaciones entéricas o parenterales, las cuáles pueden ser formulaciones sólidas tales como cápsulas o comprimidos, o formulaciones líquidas, tales como disoluciones o suspensiones. Como será evidente de lo anterior, la expresión composición nutracéutica también comprende alimentos y bebidas que contienen leucina e hidrolizados de proteínas o proteínas no hidrolizadas y/o hidratos de carbono, así como composiciones suplementarias que contienen los ingredientes activos mencionados anteriormente.

Los hidrolizados de proteínas se pueden preparar incubando una fuente de proteínas con una única proteasa

o una combinación de proteasas. Tales proteasas pueden ser cualquier tipo de proteasa, incluyendo, pero sin limitarse a, endoproteasas, aminopeptidasas, carboxipeptidasas o di- y triaminopeptidasas.

La fuente de proteínas puede ser en principio cualquier fuente de proteínas. Una fuente preferida es caseína o proteína de suero de la leche. Una composición que comprende proteína de suero de la leche según la invención puede ser cualquier composición que comprende proteína de suero de la leche, tal como leche, nata y suero lácteo de queso. Las preparaciones de proteínas de suero de la leche están comercialmente disponibles en varias formas, tales como concentrados de proteínas de suero de leche (WPC) y aislados de proteínas de suero de leche (WPI). Los sustratos proteínicos adecuados para hidrólisis también incluyen leche entera, leche desnatada, caseína ácida, caseína de cuajo, productos de suero de la leche ácidos, o productos de suero lácteo de queso. Además, los sustratos vegetales como gluten de trigo, cebada molida y fracciones proteínicas obtenidas de, por ejemplo, soja, arroz o maíz, son sustratos adecuados.

Los hidrolizados de proteína se pueden preparar poniendo en contacto el sustrato proteínico con una enzima proteolítica o una combinación de enzimas proteolíticas. En caso de que se use más de una proteasa, estas proteasas se pueden añadir simultáneamente al sustrato proteínico. Como alternativa, las proteasas se pueden añadir a la proteína en una secuencia predefinida. Opcionalmente, la adición de la siguiente proteasa es precedida por la inactivación de la proteasa o proteasas que se usaron previamente en el proceso de hidrólisis. Tal inactivación se puede lograr de diversas maneras, y el método de elección depende de la proteasa que ha de ser inactivada. Los tratamientos de inactivación incluyen, pero no se limitan a, tratamiento término y a un cambio en el pH. Como alternativa, se pueden usar hidrolizados comercialmente disponibles.

El grado de hidrólisis (DH) de un sustrato proteínico es un parámetro importante. El DH que se puede lograr para un hidrolizado de proteínas depende de un gran número de parámetros, que incluyen, pero no se limitan a, la elección de una proteasa particular, el tiempo que se deja transcurrir la hidrólisis, las condiciones de reacción (pH, temperatura, concentración de sales, etc.), y el pretratamiento del sustrato proteínico antes de que se someta a hidrólisis por la proteasa. El DH del hidrolizado adecuado para el procedimiento según la invención puede oscilar desde 5-50, preferiblemente desde 10-40, más preferiblemente desde 15-35. El hidrolizado puede contener aminoácidos libres. Los métodos para determinar el DH son conocidos por los expertos en el campo, por ejemplo el método OPA descrito por Church et al. (*Anal Biochem* (1985) 146, 343).

Los hidrolizados se pueden procesar adicionalmente de diversas maneras, incluyendo los métodos, pero sin limitarse a, el secado por pulverización, la ultrafiltración, la liofilización, el secado vacío. Después de secar, el material seco se puede moler y/o tamizar a fin de obtener fracciones de un intervalo particular de tamaños de partículas. Se pueden añadir compuestos al hidrolizado para facilitar el secado, o para influir en las características finales del hidrolizado seco, tales como su tendencia a formar grupos o su humectabilidad.

Se ha encontrado sorprendentemente que una composición que comprende leucina e hidrolizados de proteínas o leucina y proteínas sin hidrolizar o leucina, hidrolizados de proteínas e hidratos de carbono, o leucina, proteínas sin hidrolizar e hidratos de carbono, estimula sinérgicamente la secreción de insulina pancreática, y potencia la eliminación de glucosa de tejidos diana sensibles a la insulina. Los efectos de las composiciones son mucho mayores que los efectos esperados estimados por la adición de los efectos ejercidos por la leucina o hidrolizados de proteínas o proteínas sin hidrolizar o hidratos de carbono solos. De este modo, las composiciones que comprenden leucina e hidrolizados de proteínas o proteínas sin hidrolizar y/o hidratos de carbono incrementan sinérgicamente la secreción de insulina pancreática y potencian la eliminación de glucosa de tejidos diana sensibles a la insulina. Por lo tanto, las composiciones que comprenden leucina e hidrolizados de proteínas o proteínas sin hidrolizar y/o hidratos de carbono se pueden usar para evitar o tratar tanto T1DM como T2DM, y para la prevención de T2DM en aquellos individuos con prediabetes, tolerancia alterada a la glucosa (IGT), u obesidad.

El uso de combinaciones de leucina e hidrolizados de proteínas o proteínas sin hidrolizar y/o hidratos de carbono, que ejercen individualmente mecanismos de acción diferentes, es eficaz logrando y manteniendo los niveles diana de glucemia en pacientes diabéticos.

Las combinaciones de los ingredientes activos identificados anteriormente se han concebido debido a sus diferentes acciones, para aprovechar los efectos sinérgico y multiorgánico. Debido a los distintos mecanismos de acción de los ingredientes activos individuales, las combinaciones no sólo mejora en control glucémico, sino también dan como resultado una menor dosificación del fármaco en algunos escenarios, y minimizan los efectos adversos. Debido a sus distintos mecanismos y sitios de acción, las combinaciones específicas de suplementos dietéticos explicadas anteriormente también aprovechan los efectos sinérgicos para lograr un grado de reducción de glucosa mayor que el que pueden lograr los agentes individuales. De este modo, aunque las terapias de elección en el tratamiento terapéutico de T1DM y T2DM se basan esencialmente en la administración de insulina y de fármacos hipoglucémicos orales, la terapia nutricional apropiada también es de importancia primordial para el tratamiento con éxito de los diabéticos.

Se puede añadir un suplemente multivitamínico y de minerales a las composiciones nutracéuticas de la presente invención para obtener una cantidad adecuada de un nutriente esencial que falta en algunas dietas. El suplemento multivitamínico y de minerales también puede ser útil para la prevención de enfermedades y la protección frente a pérdidas y carencias nutricionales debidas a patrones de estilo de vida y patrones dietéticos inadecuados habituales

observados algunas veces en la diabetes. Además, se ha implicado al estrés oxidante en el desarrollo de resistencia a la insulina. Las especies oxigenadas reactivas pueden alterar la captación de glucosa estimulada por insulina, perturbando la cascada de señalización del receptor de insulina. El control del estrés oxidante con antioxidantes tales como α -tocóferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), puede ser valioso en el tratamiento de la diabetes. Por lo tanto, la ingesta de un suplemento multivitamínico se puede añadir a las sustancias activas mencionadas anteriormente, para mantener una nutrición bien equilibrada.

Otro uso importante de un aminoácido, preferiblemente leucina, y un hidrolizado de proteínas está en el incremento del nivel de glucógeno para una persona que necesita un aumento del nivel de glucógeno o elevar la secreción de insulina para una persona que lo necesite. Estos últimos usos pueden ser, por ejemplo, para atletas u otras personas que hagan ejercicios físicos. El hidrolizado de proteínas y la leucina se usan adecuadamente como un aditivo para uso en cualquier suplementación energética o nutriente metabólico. La suplementación energética o nutriente puede estar en forma de bebida, tal como bebidas deportivas, bebidas energéticas u otras bebidas sin alcohol, o cualquier otra preparación de nutrientes adecuada para un atleta u otra persona que necesite un aumento del nivel de glucógeno o un aumento de la producción de insulina. La suplementación energética o nutriente está preferiblemente en una forma que se puede consumir oralmente. Este aumento del nivel de glucógeno, o elevación de la secreción de insulina, puede conducir, por ejemplo, a una reconstrucción más rápida de depósitos de glucógeno, y a una reconstrucción más rápida de proteínas musculares degradadas.

Una bebida deportiva es una bebida que se supone que rehidrata a los atletas, así como que restaura electrolitos, azúcar, y otros nutrientes. Las bebidas deportivas habitualmente son isotónicas, queriendo decir que contienen las mismas proporciones de nutrientes que se encuentran en el cuerpo humano. (Fuente: http://en.wikipedia.org/wiki/Sports_drink)

Las bebidas energéticas son bebidas que contienen estimulantes (legales), vitaminas (especialmente vitaminas B) y minerales, con la intención de dar al usuario un aporte repentino y súbito de energía. Los ingredientes habituales incluyen cafeína, guaraná (cafeína procedente de la planta del guaraná), taurina, diversas formas de ginseng, maltodextrina, inositol, carnitina, creatina, glucuronolactona y ginkgo biloba. Algunas pueden contener niveles elevados de azúcar o glucosa. Muchas bebidas tienen sabor y/o están coloreadas. (Fuente: http://en.wikipedia.org/wiki/Energy_drink)

Una bebida no alcohólica es una bebida que no contiene alcohol, en oposición a las bebidas alcohólicas, que sí lo contienen. En general, la expresión se usa sólo para bebidas frías. El chocolate caliente, el té y el café, no se consideran bebidas no alcohólicas. La expresión se refiere originalmente, de forma exclusiva a bebidas carbonatadas, y todavía se usa habitualmente de esta manera (Fuente: http://en.wikipedia.org/wiki/Soft_drink)

La composición nutracéutica de la presente invención contiene leucina e hidrolizados de proteínas y un hidrato de carbono, y al menos 70% de los aminoácidos presentes es leucina. La leucina está presente adecuadamente en la composición según la invención en una cantidad para proporcionar una dosis diaria de alrededor de 0,001 g por kg de peso corporal a alrededor de 1g por kg de peso corporal del sujeto al que se le va a administrar. Un alimento o bebida contiene adecuadamente alrededor de 0,05 g por servicio hasta alrededor de 50 g por servicio de leucina. Si la composición nutracéutica es una formulación farmacéutica, tal formulación puede contener leucina en una cantidad desde alrededor de 0,001 g hasta alrededor de 1 g por unidad de dosificación, por ejemplo por cápsula o comprimido, o desde alrededor de 0,035 g por dosis diaria hasta alrededor de 70 g por dosis diaria de una formulación líquida. Los hidrolizados de proteínas están presentes adecuadamente en la composición según la presente invención en una cantidad para proporcionar una dosis diaria desde alrededor de 0,01 g por kg de peso corporal hasta alrededor de 3 g por kg de peso corporal del sujeto al que se le va a administrar. Un alimento o bebida contiene adecuadamente alrededor de 0,1 g por servicio hasta alrededor de 100 g por servicio de hidrolizados de proteínas. Si la composición nutracéutica es una formulación farmacéutica, tal formulación puede contener hidrolizados de proteínas en una cantidad desde alrededor de 0,01 g hasta alrededor de 5 g por unidad de dosificación, por ejemplo por cápsula o comprimido, o desde alrededor de 0,7 g por dosis diaria hasta alrededor de 210 g por dosis diaria de una formulación líquida.

La composición contiene leucina e hidrolizados de proteínas según se especifica anteriormente, e hidratos de carbono. Los hidratos de carbono está presentes de forma adecuada en la composición según la presente invención en una cantidad para proporcionar una dosis diaria desde alrededor de 0,01 g por kg de peso corporal hasta alrededor de 7 g por kg de peso corporal del sujeto al que se van a administrar. Un alimento o bebida contiene de forma adecuada alrededor de 0,5 g por servicio hasta alrededor de 200 g por servicio de hidratos de carbono. Si la composición nutracéutica es una formulación farmacéutica, tal formulación puede contener hidratos de carbono en una cantidad desde alrededor de 0,05 g hasta alrededor de 10 g por unidad de dosificación, por ejemplo por cápsula o comprimido, o desde alrededor de 0,7 g por dosis diaria hasta alrededor de 490 g por dosis diaria de una formulación líquida.

Intervalos de dosificación (para una persona de 70 kg)

Leucina: 0,005-70 g/día.

Hidrolizados de proteínas: 0,07-210 g/día.

Proteínas sin hidrolizar: 0,07-210 g/día.

Hidratos de carbono: 0,1-490 g/día.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1. Concentraciones (A) medidas (\pm SEM) de insulina plasmática y respuesta (B) a lo largo de un período de 4h después de la ingestión de hidrato de carbono (CHO; barras en blanco), hidrato de carbono con un hidrolizado de proteína (CHO+PRO; barras sombreadas) e hidrato de carbono, hidrolizado de proteína y leucina libre (CHO+PRO+LEU; barras en negro) en pacientes con diabetes tipo 2 (T2D) y en sujetos de control sanos (CON). *: significativamente diferente en comparación con el ensayo de CHO $P<0,05$, #: significativamente diferente en comparación con el ensayo de CHO+PRO, $P<0,05$. No se encontraron diferencias en las respuestas a la insulina entre los grupos en el mismo ensayo. $n=10$ por grupo.

Figura 2. Concentraciones (A) medias (\pm SEM) de glucosa plasmática y respuesta (B) a lo largo de un período de 4h después de la ingestión de hidrato de carbono (CHO; barras en blanco), hidrato de carbono con un hidrolizado de proteína (CHO+PRO; barras sombreadas) e hidrato de carbono, hidrolizado de proteína y leucina libre (CHO+PRO+LEU; barras en negro) en pacientes con diabetes tipo 2 (T2D) y en sujetos de control sanos (CON). *: significativamente diferente con el ensayo CHO, $P<0,05$. #: significativamente diferente del grupo con diabetes, $P<0,01$. $n=10$ por grupo.

Figura 3. Respuestas medias (\pm SEM) de aminoácidos esenciales (sin leucina, EAA-LEU) y no esenciales (NEAA) plasmáticos durante un período de 4h después de la ingestión de hidrato de carbono (CHO), hidrato de carbono con un hidrolizado de proteína (CHO+PRO), e hidrato de carbono, un hidrolizado de proteína y leucina libre (CHO+PRO+LEU) en pacientes con diabetes tipo 2 (A) y en sujetos de control sanos (B). *: significativamente diferente en comparación con el ensayo de CHO, $P<0,05$; #: significativamente diferente comparado con el ensayo de CHO+PRO, $P<0,05$. No se encontraron diferencias en las respuestas de aminoácidos entre grupos dentro del mismo ensayo. $n=10$ por grupo.

Los siguientes Ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar mediante procedimientos de formulación convencionales usando los ingredientes especificados a continuación:

Ejemplo 1 (No según la invención)

Cápsula de gelatina blanda

Las cápsulas de gelatina blandas se prepararon mediante procedimientos convencionales usando los ingredientes especificados a continuación:

Ingredientes activos: leucina 0,1 g, hidrolizados de proteínas 0,3 g

Otros ingredientes: glicerol, agua, gelatina, aceite vegetal.

Ejemplo 2 (No según la invención)

Cápsula de gelatina dura

Las cápsulas de gelatina duras se prepararon mediante procedimientos convencionales usando ingredientes especificados a continuación:

Ingredientes activos: leucina 0,3 g, hidrolizados de proteínas 0,7 g

Otros ingredientes:

Cargas: lactosa o celulosa o derivados de celulosa c.s.

Lubricante: estearato de magnesio si es necesario (0,5%)

Ejemplo 3 (No según la invención)

Comprimido

Los comprimidos se prepararon mediante procedimientos convencionales usando los ingredientes especificados a continuación:

Ingredientes activos: leucina 0,4 g, proteína no hidrolizada 0,4 g

Otros ingredientes: celulosa microcristalina, dióxido de silicio (SiO₂), estearato de magnesio, croscarmelosa sódica.

B. Se pueden preparar artículos alimentarios mediante procedimientos convencionales usando los ingredientes especificados a continuación:

Ejemplo 4

Bebida no alcohólica con 30% de zumo.

5

Cantidad típica servida: 240 ml.

Ingredientes activos:

En este artículo alimentario se incorporó leucina e hidrolizados de proteínas y maltodextrina como fuentes de hidratos de carbono:

Leucina: 0,5-5 g/ por servicio

10

Hidrolizados de proteínas: 1,5-15 g/ por servicio.

Maltodextrina: 3-30 g/ por servicio.

I. Se preparó un compuesto de bebida no alcohólica a partir de los siguientes ingredientes:

Concentrados de zumo y sabores solubles en agua

1.1 Concentrado de naranja

15

	[g]
60,3° Brix, 5,15% de acidez	657,99

Concentrado de limón

43,5° Brix, 32,7% de acidez	95,96
-----------------------------	-------

Sabor a naranja, soluble en agua	13,43
----------------------------------	-------

20

Sabor a albaricoque, soluble en agua	6,71
--------------------------------------	------

Agua	26,46
------	-------

1.2 Color

β-Caroteno 10% CWS	0,89
--------------------	------

Agua	67,65
------	-------

25

1.3 Ácido y antioxidante

Ácido ascórbico	4,11
-----------------	------

Ácido cítrico anhidro	0,69
-----------------------	------

Agua	43,18
------	-------

1.4 Estabilizantes

30

Pectina	0,20
---------	------

Benzoato sódico	2,74
-----------------	------

Agua	65,60
------	-------

1.5 Sabores solubles en aceite

Sabor a naranja, soluble en aceite	0,34
------------------------------------	------

35

Aceite de naranja destilado	0,34
-----------------------------	------

1.6 Ingredientes activos

Ingredientes activos (esto significa el ingrediente activo mencionado anteriormente: leucina e hidrolizados de proteínas y maltodextrina en las concentraciones mencionadas anteriormente).

Los concentrados de zumos de frutas y los sabores solubles en agua se mezclan sin la incorporación de aire. El color se disuelve en agua desionizada. El ácido ascórbico y el ácido cítrico se disuelven en agua. El benzoato de sodio se disuelve en agua. La pectina se añade con agitación y se disuelve mientras hierve. La disolución se enfría. El aceite de naranja y los aromas solubles en aceite se premezclan. Los ingredientes activos, según se mencionan en el apartado 1.6, se mezclan en seco y después se agitan preferiblemente en la mezcla del concentrado de zumo de frutas (1.1).

A fin de preparar el compuesto de bebida no alcohólica, todas las partes 3.1.1 a 3.1.6 se mezclan juntas antes de homogeneizar usando un aparato Turrax y después un homogeneizador a alta presión ($p_1 = 200$ bares, $p_2 = 50$ bares).

II. Se preparó un jarabe para embotellar a partir de los siguientes ingredientes:

	[g]
Compuesto de bebida no alcohólica	74,50
Agua	50,00
Jarabe de azúcar 60° Brix	150,00

Los ingredientes del jarabe para embotellar se mezclan juntos. El jarabe para embotellar se diluye con agua hasta 1l de una bebida lista para beber.

Variaciones:

En lugar de usar benzoato de sodio, la bebida se puede pasteurizar. La bebida también se puede carbonatar.

Ejemplo 5 (No según la invención)

Pan de cinco cereales

Cantidad servida típica: 50 g

Ingredientes activos:

En el artículo alimentario se incorporan leucina y proteína no hidrolizada e hidratos de carbono (en forma de harina de cinco cereales):

Leucina: 0,5-5 g/ por servicio.

Proteínas no hidrolizadas: 1,5-15 g/ por servicio.

Otros componentes:

	[%]
Harina de cinco cereales (fuente de	
Hidratos de carbono)	56,8
Agua	39,8
Levadura	2,3
Sal	1,1

La levadura se disolvió en una parte del agua. Todos los ingredientes se mezclaron juntos para formar una masa. Se añadió sal al final del tiempo de amasado. Tras fermentar, la masa se volvió a trabajar y se dividió antes de que se formase un pan. Antes de cocer, la superficie del pan se cepilló con agua y se roció con harina.

Procedimiento:

Amasado:

Sistema de amasado en espiral 4 min primer engranaje, 5 min segundo engranaje

Proceso para hacer resistente a la pasta: 60 min

Temperatura de la pasta: 22 - 24° C

Tiempo del proceso para la resistencia: 30 min

Cocción:

Horno: Horno de tipo holandés

Temperatura de cocción: 250/220°C

5 Tiempo de cocción: 50-60 min

Ejemplo 6

Galletas de tipo Milano.

Cantidad típica servida: 30 g

Ingredientes activos:

1.0 En este artículo alimentario se incorporó leucina e hidratos de proteínas e hidratos de carbono (en forma de harina de trigo, tipo 550):

Leucina: 0,3-3 g/ por servicio

Hidrolizados de proteínas: 0,9-9 g/ por servicio.

Otros componentes:

1.5		[g]
	Harina de trigo, tipo 550 (fuente de hidratos de carbono)	41,0
	Azúcar	20,5
	Grasas/mantequilla	20,5
2.0	Huevo completo (líquido)	18,0
	Sabor a limón	c.s.
	Agente de cocción	c.s.

Todos los ingredientes se añadieron lentamente con mezclamiento para formar una pasta flora dulce.

2.5 Después, la pasta se conserva en frío (4°C) durante al menos dos horas antes de aplanar la pasta hasta un grosor de aproximadamente 5 mm. Se cortan trozos y se cepillan con yema de huevo sobre la superficie antes de cocer.

Cocción:

Horno: horno de ventilador.

Temperatura de cocción: 180° C

3.0 Tiempo de cocción: 15 Ministerio

Ejemplo 7

Tostada

Cantidad típica de servicio: 100 g

Ingredientes activos:

3.5 En este producto alimentario se incorpora leucina y proteínas no hidrolizadas e hidratos de carbono (en forma de harina de trigo, tipo 550):

Leucina: 0,6-6 g/ por servicio

Hidrolizados de proteínas: 1,8-18 g/ por servicio.

Otros componentes: [%]

Harina de trigo, tipo 550

(fuente de hidratos de carbono) 55,4

Agua 33,2

5 Levadura 2,8

Sal 1,1

Grasa/mantequilla 5,5

Malta 0,6

Agente de cocción emulsionante 1,4

10 La levadura se disolvió en una parte del agua. Todos los ingredientes se mezclaron juntos para formar una masa. Se añadió sal al final del tiempo de amasado. Después, la masa se volvió a trabajar, se dividió y se colocó en una tinaja de cocción para la fermentación. Tras la cocción, el pan se moldea directamente.

Procedimiento:

Amasado:

15 Sistema de amasado en espiral 5-6 min primer engranaje; 3-4 min segundo engranaje

Proceso para hacer resistente la masa: ninguno

Temperatura de la masa: 22 - 24° C

Tiempo para el proceso para la resistencia: 40 min

Cocción:

20 Horno: Horno de tipo holandés

Temperatura de cocción: 220°C

Tiempo de cocción: 35-40 min

Ejemplo 8

Yogur-tipo endurecido; 3,5% de grasas.

25 Cantidad típica de servicio: 225 g

Ingredientes activos:

En este artículo alimentario se incorporó leucina e hidrolizados de proteínas e hidratos de carbono (en forma de azúcar):

Leucina: 0,5-5 g/ por servicio

30 Hidrolizados de proteínas: 1,5-15 g/ por servicio.

Otros componentes:

[g]

Leche entera (3,8% de grasa) 90,5

Polvo de leche desnatada 2,0

35 Azúcar (fuente de hidratos de carbono) 5,0

Cultivo 2,5

La leche se calentó hasta 35° C antes de añadir polvo de leche, estabilizante, azúcar y los ingredientes activos. Esta mezcla se calentó hasta 65° C para disolver todos los ingredientes. Después, la mezcla se homogeneizó en un homogeneizador alta presión ($p_1 = 150$ bares, $p_2 = 50$ bares) a 65° C. Esta emulsión se pasteurizó entonces a 80° C

durante 20 minutos. Tras enfriar hasta 45° C, se añadió yogur natural/cultivo, y se mezcló. Después, esta mezcla se introdujo en copas y se puso a fermentar a 45° C durante 3-4 horas hasta que se alcanzó un pH de 4,3, y después se almacenó a 4° C.

Ejemplo 9

5	Yogur – tipo agitado; 3,5% de grasas	
	Cantidad típica de servicio: 225 g	
	En este artículo alimentario se incorporó leucina e hidrolizados de proteínas e hidratos de carbono (en forma de azúcar):	
	Leucina: 0,1-1 g/ por servicio	
10	Hidrolizados de proteínas: 0,3-3 g/ por servicio.	
	Otros componentes:	[%]
	Leche entera (3,8% de grasa)	90,2
	Polvo de leche desnatada	2,0
	Estabilizante	0,3
15	Azúcar (fuente de hidratos de carbono)	5,0
	Cultivo	2,5.

La leche se calentó hasta 35° C antes de la adición de polvo de leche, estabilizante, azúcar e ingredientes activos. Esta mezcla se calentó hasta 65° C para disolver todos los ingredientes antes de la homogeneización en un homogeneizador a alta presión (p₁ = 150 bares, p₂ = 50 bares) a 65° C. Esta emulsión se pasteurizó entonces a 80° C durante 20 minutos. Tras enfriar hasta 45° C, se añadió y se mezcló yogur natural/cultivo, seguido de la fermentación a 45° C durante 3-4 horas hasta que se alcanzó un pH de 4,3. Tras enfriar y agitar vigorosamente, el yogur se introdujo en copas y se almacenó a 4° C.

Ejemplo 10

25	Helado; 8% de grasas	
	Cantidad típica por servicio: 85 g	
	Ingredientes activos:	
	En el artículo alimentario se incorporó leucina e hidrolizados de proteínas e hidratos de carbono (en forma de azúcar y jarabe de glucosa):	
	Leucina: 0,1-1 g/ por servicio	
30	Hidrolizados de proteínas: 0,3-3 g/ por servicio.	
	Otros componentes:	[%]
	Leche entera (3,7% de grasa)	600,00
	Nata (35% de grasa)	166,00
	Polvo de leche desnatada	49,10
35	Azúcar (fuente de hidratos de carbono)	109,00
	Jarabe de glucosa (80%) (fuente de hidratos de carbono)	70,00
	Estabilizante del helado	5,00
	Sabor	c.s.
40	Color	c.s.

Se añadieron azúcar, polvo de leche desnatada y el estabilizante a la leche y nata, se mezclaron y se calen-

taron hasta 45° C. Después se añadió el color como disolución madre y el jarabe de glucosa, así como los ingredientes activos. La mezcla se calentó y se pasteurizó (20 min, 80° C). Después tiene lugar una etapa de homogeneización. después, la mezcla se enfrió con agitación constante, y se añadió el sabor a 5° C. La mezcla maduró a 5° C durante al menos 4 h, y después se hizo pasar a través de una máquina para hacer helados (sobrerrendimiento aprox. 100%). El helado se introdujo en copas y se almacenó a -20 hasta -30° C.

Ejemplo 11

Gominolas

Ingredientes activos:

En este artículo alimentario se incorporó leucina e hidrolizados de proteínas e hidratos de carbono (en forma de azúcar cristalizada y jarabe de glucosa DE 38):

Leucina: 0,05-0,5 g/ por 30 g

Hidrolizados de proteínas: 0,15-1,5 g/ por 30 g.

Otros componentes:	[g]
Gelatina 200 Bloom	80,0
Agua I	125,0
Azúcar cristalizada (fuente de hidratos de carbono)	290,0
Agua II	120,0
Jarabe de glucosa DE 38 (fuente de hidratos de carbono)	390,0
Ácido cítrico	10,0
Sabor	2,0
Color	c.s.
Rendimiento aprox.	1000,0

Dispersar la gelatina en agua I, agitar y disolver calentando sobre un baño de vapor o usando un microonda. Mezclar el azúcar con el agua II y llevar a ebullición hasta que se obtiene una disolución clara. Eliminar la fuente de calor. Mezclar con el jarabe de glucosa mientras que la disolución del azúcar disuelto está todavía caliente. Añadir lentamente la disolución de gelatina. Dejar reposar hasta que se puede retirar una espuma sobre la superficie y se alcanzan 60-65° C. Añadir sabor, ácido cítrico y la disolución del color, así como los ingredientes activos, con agitación. Depositar en moldes en bandejas de almidón, y dejar reposar durante al menos 48 horas a RT. Eliminar el polvo de almidón y pulir con aceite o cera. Secar a RT y envasar en saquitos herméticos al aire.

Ejemplo 12

Este ejemplo muestra las respuestas a la insulina y a la glucosa postprandiales tras la coingestión de un hidrolizado proteínico insulínico con y sin leucina adicional combinado con un único bolo de hidrato de carbono. Diez pacientes masculinos con diabetes de tipo 2, con diagnóstico a largo plazo, y diez sujetos de control sanos participaron en 3 ensayos, en los que se determinaron las respuestas a la glucosa, insulina y aminoácidos plasmáticos tras la ingestión de diversas composiciones de bebidas (hidrato de carbono, CHO; hidrato de carbono con hidrolizado de proteína, CHO+PRO; o hidrato de carbono, hidrolizado de proteína, y leucina libre, CHO+PRO+LEU). Las respuestas a la insulina plasmática fueron 141 y 204% mayores en los pacientes con diabetes de tipo 2, y 66 y 221% mayores en los controles en el ensayo de CHO+PRO y el de CHO+PRO+LEU, respectivamente, cuando se compara con el ensayo de CHO (P<0,05). Las respuestas a la glucosa plasmática concomitantes fueron 15 y 12% más bajas en los pacientes con diabetes de tipo 2, y 92 y 97% más bajas en los controles, respectivamente, cuando se comparan con el ensayo de CHO (P<0,05). Las concentraciones de leucina plasmática se correlacionaron fuertemente con la respuesta a la insulina (r=0,43, P<0,001). Se concluye que la coingestión de un hidrolizado de proteínas con o sin leucina libre adicional aumenta la respuesta a la insulina tras la ingestión de hidratos de carbono, reduciendo significativamente de ese modo las exclusiones de glucosa postprandial en pacientes con diabetes de tipo 2 con diagnóstico a largo plazo.

SUJETOS Y MÉTODOS

Sujetos

5 Para participar en este estudio se seleccionaron diez pacientes masculinos con diabetes de tipo 2, diagnosti-
cados a largo plazo, y diez sujetos de control sanos, con edad y BMI parecidos. En la Tabla 1 se proporcionan las caracte-
rísticas de los sujetos. Los criterios de exclusión fueron función renal o hepática alterada, obesidad (BMI>35 kg/m²),
cardiopatía, hipertensión, complicaciones de la diabetes, y terapia con insulina exógena. Todos los pacientes con diabe-
tes de tipo 2 estaban usando medicación oral reductora de la glucosa plasmática (metformina y/o sulfonilureas). La
10 medicación reductora de la glucemia se detuvo durante dos días antes de la determinación, y las sulfonilureas, pero no
la metformina, se detuvieron dos días antes de cada uno de los ensayos. A todos los sujetos se les informó sobre la
naturaleza y los riesgos de los procedimientos experimentales antes de que se obtuviese su autorización escrita. Todos
los ensayos clínicos fueron aprobados por el Comité Ético Médico local.

Tabla 1. Características de los sujetos¹

	Controles	Diabetes tipo 2
<i>n</i>	10	10
Edad (años)	60,2±1,3	59,7±2,6
Peso corporal (kg)	83,7±3,1	83,6±3,4
Altura (m)	1,75±0,01	1,77±0,02
BMI (kg/m ²)	27,2±1,00	26,8±0,82
Glucosa plasmática basal (mmol/l)	5,8±0,1	10,3±0,7*
Glucosa plasmática _{OGTT120} (mmol/l) ²	6,1±0,4	19,7±0,8 [#]
Insulina plasmática basal (mU/l)	14,2±1,3	14,1±2,7
HbA1c (%)	5,6±0,1	8,1±0,3
OGIS ₁₂₀ (ml/min/m ²) ³	351±16	258±13
Diagnosticado con diabetes tipo 2 (años)	NA	9,2±1,44
Medicación	NA	Metformina y/o derivados de SU

¹ Los valores se expresan como medias ± SEM

² Concentración de glucosa plasmática después de un OGTT de 2h.

15 ³ Índice de sensibilidad a la insulina oral para un OGTT de 2 horas como se describe en cualquier otra parte (22).

* Diferente del grupo de control P<0,01.

[#] Diferente de los valores basales P<0,01.

Determinación

20 Antes de la selección para el estudio, todos los sujetos realizaron un ensayo de tolerancia a la glucosa oral
(OGTT). Tras un ayuno durante toda la noche, los sujetos llegaron al laboratorio a las 8.00 am por coche o transporte
público. Se insertó un catéter (Baxter BV, Utrecht, Países Bajos) en una vena antecubital, y se extrajo una muestra de
sangre en reposo, después de lo cuál se ingirieron 75 g de glucosa (disuelta en 250 ml de agua). Después de que se
consumió el bolo, la sangre se muestreó cada 30 minutos hasta t=120 min. Las concentraciones de glucosa plasmática
se midieron para determinar la intolerancia a la glucosa y/o diabetes de tipo 2 según los criterios de la Organización
25 Mundial de la Salud de 1999 (véase: Alberti, K. G. y Zimmet, P. Z. (1998) Definition, diagnosis and classification of di-
abetes mellitus and its complications. Par 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO
consultation. Diabet Med 15: 539-553. Además, las concentraciones de glucosa e insulina plasmáticas se usaron para
evaluar la sensibilidad a la insulina usando el índice de sensibilidad a la insulina de glucosa oral (OGIS) durante un
OGTT de dos horas, como se describe por Mari et al J. J. (2001). Diabetes Care 24: 539-548.

30 Diseño

Cada sujeto participó en 3 ensayos, separados al menos 7 días, en los que se determinaron las respuestas a
la glucosa, a la insulina y a aminoácidos plasmáticos tras la ingestión de 3 composiciones de bebidas diferentes (CHO:

hidrato de carbono, CHO+PRO: hidrato de carbono con un hidrolizado proteínico de caseína, o CHO+PRO+LEU: hidrato de carbono, un hidrolizado proteínico de caseína y leucina). Los sujetos se colocaron en posición supina y permanecieron inactivos durante un período de 4 horas. Las bebidas se suministraron de forma aleatoria y de manera a ciegas.

Protocolo

5 Tras un ayuno durante toda la noche, los sujetos se presentaron en el laboratorio a las 8.00 am por coche o transporte público. Se insertó un catéter de teflón (Baxter BV, Utrecht, Países Bajos) en una vena antecubital para la toma de muestras de sangre venosa, y se recogió una muestra de sangre en reposo. A t=0 minutos, los sujetos bebieron un único bolo (4 ml/kg) de la bebida experimental. Se tomaron muestras de sangre cada 15 minutos durante la primera hora, después de lo cual la sangre se muestreó a intervalos de 30 minutos hasta t=240 minutos, para la medida de las concentraciones de glucosa e insulina plasmáticas. Las concentraciones de aminoácidos plasmáticos se determinaron a intervalos de una hora.

Dieta y actividad antes del ensayo.

15 Todos los sujetos mantuvieron sus patrones dietéticos y de actividad física normales durante todo el período experimental. Además, los sujetos se abstuvieron de realizar trabajos físicos pesados y/o entrenamiento deportivo durante al menos 3 días antes de cada ensayo, y rellenaron un diario de la ingesta de alimentos durante 2 días antes del primer ensayo, para mantener su ingesta dietética tan idéntica como fuese posible antes de los otros ensayos. La noche antes del ensayo, los sujetos recibieron una comida estándar (43,80 kJ/kg de peso corporal; que consiste en hidratos de carbono con 60% de energía (En%) grasa con 28 En% y proteína con 12 En%).

Bebidas.

20 Los sujetos recibieron un único bolo (4ml/kg) que contiene 0,7 g/kg de hidrato de carbono (50% de glucosa y 50% de maltodextrina, CHO) con 0,3 g/kg de un hidrolizado de proteína de caseína (CHO+PRO) o 0,3 g/kg de un hidrolizado proteínico de caseína y 01 g/kg de leucina (CHO+PRO+LEU). La glucosa y la maltodextrina se obtuvieron de AVEBE (Veendam, Países Bajos), la leucina cristalina de BUFA (Uitgeest, Países Bajos), y el hidrolizado proteínico de caseína se preparó por DSM Food Specialties (Delft, Países Bajos). El hidrolizado de caseína (Insuvital™) se obtuvo mediante hidrólisis enzimática de caseinato de sodio usando una proteasa neutra y una endoproteinasa específica de protilo. Las bebidas se aromatizaron uniformemente añadiendo 0,2 g de sacarinato de sodio, 1,8 g de ácido cítrico, y 5 g de sabor de crema de vainilla (Quest International, Naarden, Países Bajos) por litro de bebida.

Análisis de las muestras de sangre.

30 La sangre se recogió en tubos que contienen EDTA, y se centrifugó a 1,000 g y 4°C durante 10 minutos. Se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido alícuotas del plasma, y se almacenaron a -80°C hasta lo análisis. Las concentraciones de glucosa (Uni Kit III, Roche, Basilea) se analizaron con el analizador semiautomático COBAS FARA (Roche). La insulina plasmática se determinó mediante radioinmunoensayo (HI-14K, Linco research Inc, St. Charles, USA). Los aminoácidos libres se analizaron usando cromatografía de intercambio iónico (JEOL, AminoTac JLC-500N) con derivatización con ninhidrina postcolumna, con norvalina como patrón interno. Antes de los análisis, las muestras se desproteinaron con ácido 5-sulfosalicílico. Para determinar el contenido de HbA1c, se recogió una muestra de sangre de 3 ml en tubos que contienen EDTA y se analizó mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones (Bio-Rad Diamat, Munich, Alemania).

Estadística.

40 Los datos se expresaron como medidas \pm SEM. Las respuestas plasmáticas se calcularon como área bajo la curva por encima de los valores de referencia. Para comparar las concentraciones de los metabolitos en plasma a lo largo del tiempo entre ensayos, se aplicó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Se comprobaron los cambios en el tiempo dentro de cada grupo para determinar la significancia estadística usando medidas repetidas de una vía ANOVA. Se aplicó un ensayo post-hoc de Scheffé en caso de una relación F significativa, para localizar diferencias específicas. Para variables no dependientes del tiempo, se aplicó un ANOVA de múltiples vías o la prueba de la t de Student. La significancia se determinó al nivel de 0,05 de confianza. Todos los cálculos se realizaron usando StatView 5.0 (SAS Institute inc., Cary, NC, USA).

RESULTADOS

Concentraciones de insulina plasmática.

50 Las concentraciones de insulina plasmática de referencia fueron similares entre grupos y ensayos, y fueron de promedio $11,2 \pm 1,5$ y $13,0 \pm 1,1$ mU/l para el grupo con diabetes de tipo 2 y el grupo de control, respectivamente (Fig. 1A, P=0,1). Tras la ingestión de las diferentes bebidas, las concentraciones de insulina plasmática no aumentaron en el ensayo de CHO+PRO, y se incrementaron en los ensayos de CHO+PRO y de CHO+PRO+LEU en los pacientes con diabetes tipo 2 (P<0,05). En el grupo de control, se observó un fuerte incremento en la concentración de insulina plasmática durante la primera hora tras la ingestión de la bebida (P<0,05). Este incremento fue muy pronunciado en los ensayos de CHO+PRO y CHO+PRO+LEU. En todos los ensayos, las concentraciones de insulina plasmática volvieron a los

valores de las concentraciones de referencia durante la última hora de la parte experimental, en ambos grupos. Las respuestas a la insulina (AUC por encima de los valores de referencia) en el grupo de diabetes fueron 141 ± 40 y $204 \pm 37\%$ mayor en el ensayo de CHO+PRO y de CHO+PRO+LEU, respectivamente, cuando se comparó con el ensayo de CHO ($P < 0,05$, Fig 1B). En el grupo de control, las respuestas a la insulina fueron 66 ± 20 y $221 \pm 82\%$ mayor en el ensayo de CHO+PRO y de CHO+PRO+LEU, respectivamente, en comparación con el ensayo de CHO ($P < 0,05$). Además, en el grupo de control, la respuesta a la insulina en el ensayo de CHO+PRO+LEU fue significativamente mayor comparada con el ensayo de CHO+PRO ($P < 0,05$). No se observaron diferencias en las respuestas a la insulina entre grupos dentro del mismo ensayo.

Concentraciones de glucosa plasmática.

Las concentraciones de glucosa plasmática en ayunas fueron mayores en los pacientes con diabetes de tipo 2 comparadas con los controles normoglucémicos ($8,6 \pm 0,6$ frente a $5,7 \pm 0,1$ mmol/l, respectivamente, $P < 0,01$). Tras la ingestión de las diferentes bebidas, las concentraciones de glucosa plasmática siguieron siendo significativamente mayores en los pacientes con diabetes en comparación con sus controles equiparables, en todos los ensayos ($P < 0,01$, Fig. 2A). En los pacientes con diabetes tipo 2, las concentraciones de glucosa plasmática aumentaron significativamente durante la primera hora tras la ingestión de la bebida, después de lo cuál los valores volvieron a casi los valores de referencia (Fig 2A). Las concentraciones de glucosa plasmática en el grupo de control incrementaron durante los primeros 30 minutos después de la ingestión de las bebidas de prueba, después de lo cuál las concentraciones de glucosa plasmática también volvieron a los valores de referencia. En el grupo de control, las concentraciones de glucosa plasmática disminuyeron de forma más rápida en los ensayos de CHO+PRO y de CHO+PRO+LEU en comparación con el ensayo de CHO, dando como resultado concentraciones de glucosa plasmática más bajas a $t=45$ y $t=60$ min ($P < 0,05$, Fig 2A). Después de expresar la respuesta a la glucosa postprandial como el área bajo la curva por encima de los valores de referencia (Fig 2B), las respuestas a la glucosa se redujeron en 15 ± 5 y $12 \pm 3\%$ en el grupo con diabetes tipo 2, y en 92 ± 2 y $97 \pm 3\%$ en el grupo de control en los ensayos de CHO+PRO y de CHO+PRO+LEU, respectivamente, cuando se comparan con el ensayo de CHO ($P < 0,05$). Las respuestas a la glucosa plasmática fueron sustancialmente mayores en los pacientes con diabetes cuando se comparan con los controles en todos los ensayos ($P < 0,01$, Fig 2B). Las respuestas a la glucosa se correlacionaron inversamente con la respuesta a la insulina que le acompaña en pacientes con diabetes tipo 2 ($r = -0,48$, $P < 0,01$).

Concentraciones de aminoácidos plasmáticos

En la Tabla 2 se dan las concentraciones de aminoácidos plasmáticos en ayunas.

Tabla 2. Concentraciones de aminoácidos plasmáticos basales¹

	Controles	Diabetes tipo 2
1-Metil-histidina	$9,5 \pm 1,3$	$9,4 \pm 1,4$
3-Metil-histidina	$22,3 \pm 2,5$	$27,7 \pm 2,0$
α -Aminobutirato	$29,2 \pm 1,1$	$31,5 \pm 1,1$
Alanina	$370,3 \pm 19,2$	$431,1 \pm 17,0^*$
Arginina	$128,1 \pm 7,0$	$110,2 \pm 3,5^*$
Asparagina	$10,0 \pm 0,5$	$11,0 \pm 0,6$
Ácido aspártico	$39,0 \pm 1,1$	$34,8 \pm 1,2$
Citrulina	$48,9 \pm 1,6$	$43,7 \pm 3,1$
Cisteína	$54,1 \pm 1,4$	$54,8 \pm 1,4$
Glutamina	$94,3 \pm 4,3$	$109,7 \pm 5,9^*$
Ácido glutámico	$528,5 \pm 7,4$	$508,4 \pm 14,4$
Glicina	$208,2 \pm 8,8$	$207,8 \pm 9,5$
Histidina [†]	$71,9 \pm 1,7$	$69,0 \pm 1,7$
Isoleucina [†]	$66,0 \pm 2,0$	$79,1 \pm 2,3^*$
Leucina [†]	$122,8 \pm 3,0$	$144,9 \pm 3,2^*$

Lisina [†]	187,8±4,7	204,2±5,4*
Metionina [†]	21,7±0,6	20,6±0,7
Ornitina	50,4±1,6	51,7±1,4
Fenilalanina [†]	52,6±1,2	50,5±1,0
Prolina	77,1±3,1	94,7±5,8
Serina	92,7±1,7	90,1±3,0
Treonina [†]	112,0±3,7	118,6±4,6
Triptófano [†]	41,3±2,3	37,5±1,9
Tirosina	62,3±2,9	56,8±2,0
Valina [†]	216,7±5,0	252,4±4,9

[†] Los valores se expresan (en $\mu\text{moles/l}$) como medias \pm SEM, $n=10$ para pacientes con diabetes tipo 2 y $n=10$ para controles.

[†] Aminoácido esencial.

* Diferente del grupo de control $P<0,05$.

5 Al inicio, las concentraciones de los aminoácidos esenciales (EAA) plasmáticos: leucina ($144,9\pm3,2$ y $122,8\pm3,0$ pmol/l), isoleucina ($79,1\pm2,3$ vs. $66,0\pm2,0$ pmol/l), lisina ($204,2\pm5,4$ vs. $187,8\pm4,7$ pmol/l) y valina ($252,4\pm4,9$ vs. $216,7\pm5,0$ pmol/l) y de los aminoácidos no esenciales (NEAA): alanina ($431\pm17,0$ vs. $370,3\pm19,2$ pmol/l), glutamina ($109,7\pm5,9$ vs. $94,3\pm4,3$ pmol/l) y prolina ($94,7\pm5,8$ vs. $77,1\pm3,1$ pmol/l) fueron mayores en los pacientes con diabetes tipo 2 en comparación con sus controles equiparables ($P<0,05$). Las concentraciones de arginina ($110\pm0,6$ vs. $128,1\pm7,0$ pmol/l) y de ácido aspártico ($34,8\pm1,2$ vs. $39,0\pm1,1$ pmol/l) plasmáticas fueron menores en el estado basal, en ayunas, en los pacientes con diabetes tipo 2, cuando se comparan con los sujetos del control ($P<0,05$). En la Tabla 3 se proporciona un repaso completo de las respuestas subsiguientes a los aminoácidos libres plasmáticos, calculadas como área bajo la curva por encima de los valores iniciales.

Tabla 3. Respuestas de aminoácidos plasmáticos tras la ingestión de bebida¹

	Controles			Diabetes tipo 2		
	CHO	CHO+PRO	CHO+PRO+LEU	CHO	CHO+PRO	CHO+PRO+LEU
1-Metil-histidina	-0,2±0,1	-0,2±0,2	-0,1±0,1	-0,5±0,2	-0,2±0,1	-0,2±0,2
3-Metil-histidina	-1,1±0,7	1,3±0,5 ⁺	0,6±0,6	-1,8±0,6	-0,1±0,3*	-0,5±0,6
α -Aminobutirato	-0,6±0,3	0,1±0,3	-0,7±0,1	-0,5±0,2	-0,2±0,2	-0,7±0,3
Alanina	-0,9±5,7	13,0±4,9	5,8±4,5	5,4±5,2	11,8±4,8	3,7±6,3
Arginina	-3,1±1,3	0,4±1,0	-0,5±3,4	-2,7±1,8	0,3±0,9	0,7±1,3
Asparagina	-2,1±0,4	1,4±0,3 ⁺	0,2±0,2 ^{##}	-0,8±0,3	1,2±0,4 ⁺	0,3±0,5
Ácido aspártico	-0,2±0,2	0,3±0,1	-0,4±0,2	-0,3±0,3	0,4±0,2	-0,2±0,1
Citrulina	-3,8±0,5	-0,3±0,4 ⁺	1,1±0,2 ⁺	-3,4±0,8	-1,3±0,7	0,1±1,0 ⁺
Cisteína	-0,8±0,3	-0,8±0,4	-1,0±0,2	-0,3±0,3	-0,6±0,1	-0,7±0,3
Ácido glutámico	-12,5±2,7	-2,7±1,4 ⁺	3,6±1,7 ⁺	-4,0±3,2	-1,5±2,6	-0,4±10,0
Glutamina	-3,9±0,9	0,0±2,0	-4,7±1,4	-1,0±1,5	0,2±1,3	2,3±1,2
Glicina	-6,1±0,8	-3,8±0,9	-6,1±1,0	-4,0±1,7	-4,3±1,0	-7,1±1,8
Histidina [†]	-1,4±0,6	1,0±0,4 ⁺	-0,3±0,4	-1,7±0,5	0,2±0,6 ⁺	-1,0±0,6

Isoleucina [†]	-4,2±0,6	4,4±0,5 ⁺	-1,4±0,8	-4,4±0,7	4,9±0,9 ⁺	0,7±0,8 ^{*#}
Leucina [†]	-7,5±1,1	5,6±0,9 ⁺	81,7±4,3 ^{*#}	-7,9±1,0	5,4±1,3 ⁺	80,3±26,9 ^{*#}
Lisina [†]	-4,9±0,9	11,1±1,2 ⁺	11,4±1,1 ⁺	-4,2±1,2	8,2±1,9 ⁺	6,8±1,0 ⁺
Metionina [†]	-1,5±0,2	1,6±0,3 ⁺	0,9±0,3 ⁺	-1,0±0,2	1,5±0,2 ⁺	0,9±0,3 ⁺
Ornitina	-2,1±0,2	2,0±0,4 ⁺	2,8±0,3 ⁺	-2,5±0,4	1,7±0,3 ⁺	2,7±0,5 ⁺
Fenilalanina [†]	-2,3±0,4	1,7±0,4 ⁺	0,5±0,4	-1,5±0,3	1,1±0,2 ⁺	0,8±0,7 ⁺
Prolina	-1,8±0,7	9,4±0,9 ⁺	6,7±0,9 ⁺	-2,4±0,8	9,5±1,1 ⁺	8,0±1,1 ⁺
Serina	-4,3±0,6	2,6±0,6 ⁺	-0,2±0,5 ^{*#}	-1,8±0,5 ⁺	2,6±0,9 ⁺	0,0±1,4
Treonina [†]	-4,5±0,9	4,6±0,8 ⁺	1,3±0,7 ^{*#}	-3,2±0,9	3,9±1,1 ⁺	1,2±1,5 ⁺
Triptofano [†]	-2,3±0,8	1,7±0,9 ⁺	0,1±0,7	-2,1±0,9	0,5±0,3 ⁺	-1,6±0,7
Tirosina	-3,3±0,5	5,0±0,7 ⁺	4,1±1,3 ⁺	-2,6±0,4	3,7±0,6 ⁺	3,3±0,7 ⁺
Valina	-8,4±0,8	11,8±1,5 ⁺	0,2±1,2 ^{*#}	-7,7±1,4	10,9±1,7	3,5±1,3 ^{*#}

[†]Los valores son áreas bajo la curva menos el inicial (en mmol/l/4h), y se expresan como medias ±SEM, n= 10 para pacientes con diabetes tipo 2, y n= 10 para controles.

[†]Aminoácido esencial.

⁺Diferente del grupo de control entre ensayos P<0,05.

5 ^{*}Diferente del ensayo de CHO en los grupos P<0,05.

[#]Diferente del ensayo de CHO+PRO en los grupos P<0,05.

10 Generalmente, las respuestas a los aminoácidos fueron negativas en el ensayo de CHO, positivas en el ensayo de CHO+PRO, y de un valor intermedio tras la coingestión de leucina en el ensayo de CHO+PRO+LEU. Se observaron fuertes correlaciones positivas entre la respuesta a insulina y los incrementos en leucina (P<0,001), citrulina (P<0,001), cisteína (P<0,04), lisina (P<0,001), metionina (P<0,04), ornitina (P<0,01) y prolina (P<0,01). Cuando se calculan las respuestas para la respuesta a los aminoácidos no esenciales (NEAA) y esenciales, con la excepción de la leucina suplementada (EAALEU), se observaron las siguientes respuestas en el grupo con diabetes tipo 2 (Fig 3A) y del control (Fig 3B). En el grupo con diabetes tipo 2, la respuesta a EAA-LEU fue negativa en el ensayo de CHO, y significativamente mayor en los ensayos de CHO+PRO y de CHO+PRO+LEU (-27,7±5,8 vs. 31,2±6,1 y 11,5±4,6 mmol/L/4h, respectivamente P<0,05). Además, la respuesta a EAA-LEU fue significativamente menor (60±4%, P<0,05) en el CHO+PRO+LEU, en comparación con el ensayo de CHO+PRO. Las respuestas a NEAA plasmáticos fueron negativas en el ensayo de CHO, y fueron significativamente mayores en los ensayos de CHO+PRO y CHO+PRO+LEU en los pacientes con diabetes (-28,8±14,7 vs. 23,1±8,8 y 10,2±13,8 mmol/L/4h, respectivamente; P<0,05). Se observaron hallazgos similares en el grupo de control. En el ensayo de CHO se observó una respuesta negativa a EAA-LEU plasmático, y se observaron respuestas significativamente mayores a EAA-LEU en los ensayos de CHO+PRO y de CHO+PRO+LEU (-35,0±6,7 vs. 37,9±5,1 y 12,7±4,1 mmol/L/4h, respectivamente; P<0,05). La adición de leucina en el ensayo de CHO+PRO+LEU dio como resultado una respuesta a EAA-LEU plasmático 65±5% menor cuando se compara con el ensayo de CHO+PRO (P<0,05). Las respuestas a NEAA plasmáticos fueron negativos en el ensayo de CHO+PRO, y fueron significativamente mayores en los ensayos de CHO+PRO y de CHO+PRO+LEU (-60,8±13,6 vs. 27,6±10,6 y 11,2±9,8 mmol/L/4h, respectivamente; P<0,05). No se observaron diferencias entre grupos en las respuestas a aminoácidos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende leucina, un hidrolizado de proteínas y un hidrato de carbono, y en la que al menos 70% en peso de los aminoácidos presentes es leucina.
- 5 2. Una composición de la reivindicación 1, en la que al menos 80% en peso de los aminoácidos presentes es leucina.
3. Una composición según la reivindicación 1 o 2, en la que al menos 90% en peso de los aminoácidos presentes es leucina.
- 10 4. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es adecuada para el tratamiento o prevención de diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) en aquellos individuos con prediabetes o tolerancia alterada a la glucosa (IGT), u obesidad, o diabetes mellitus tipo 2 consolidada.
5. Una composición de la reivindicación 1, en la que está presente proteína no hidrolizada.
6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende leucina en una cantidad suficiente para administrar a un sujeto una dosis diaria de 0,005 g por kg de peso corporal a alrededor de 1 g por kg de peso corporal.
- 15 7. Una composición según las reivindicaciones 1 a 6, que comprende hidrolizados de proteínas en una cantidad suficiente para administrar a un sujeto una dosis diaria de 0,01 g por kg de peso corporal a alrededor de 3 g por kg de peso corporal.
- 20 8. Una composición según la reivindicación 5, que comprende proteínas no hidrolizadas en una cantidad suficiente para administrar a un sujeto una dosis diaria de 0,01 g por kg de peso corporal a alrededor de 3 g por kg de peso corporal.
9. Una composición según la reivindicación 1, que comprende hidratos de carbono en una cantidad suficiente para administrar a un sujeto una dosis diaria de 0,01 g por kg de peso corporal a alrededor de 7 g por kg de peso corporal.
- 25 10. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para incrementar la insulina plasmática.
11. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para incrementar la insulina plasmática de pacientes con diabetes tipo 2 o con prediabetes.
12. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para reducir las concentraciones de glucosa postprandial en la sangre de pacientes con diabetes tipo 2 o con prediabetes.
- 30 13. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para incrementar la secreción de insulina postprandial en sangre de pacientes con diabetes tipo 2 o con prediabetes.

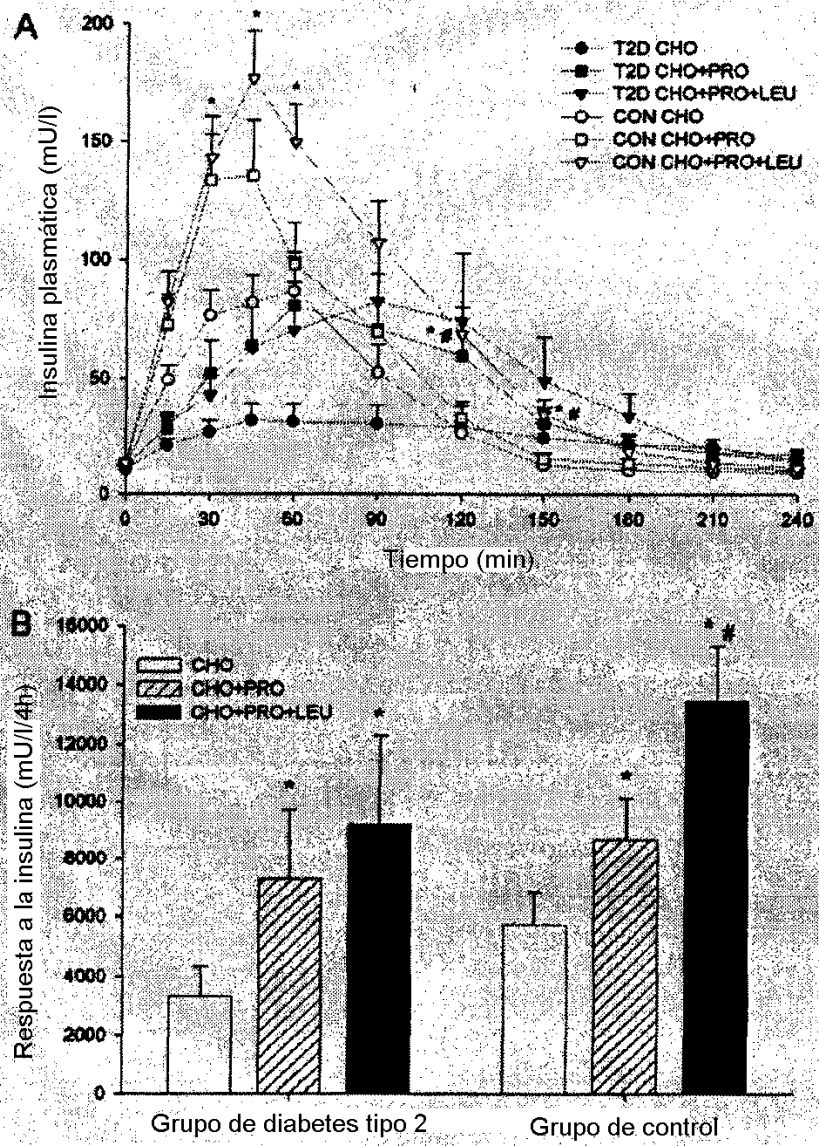


Fig. 1

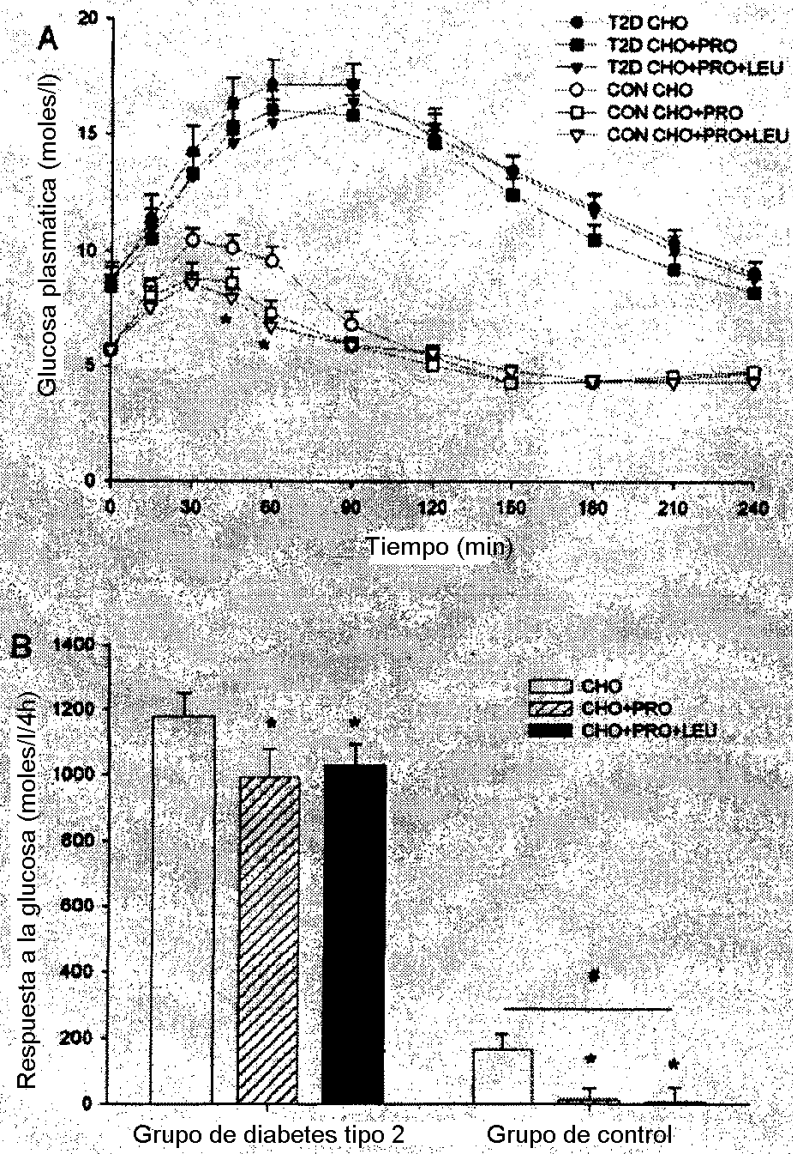


Fig. 2

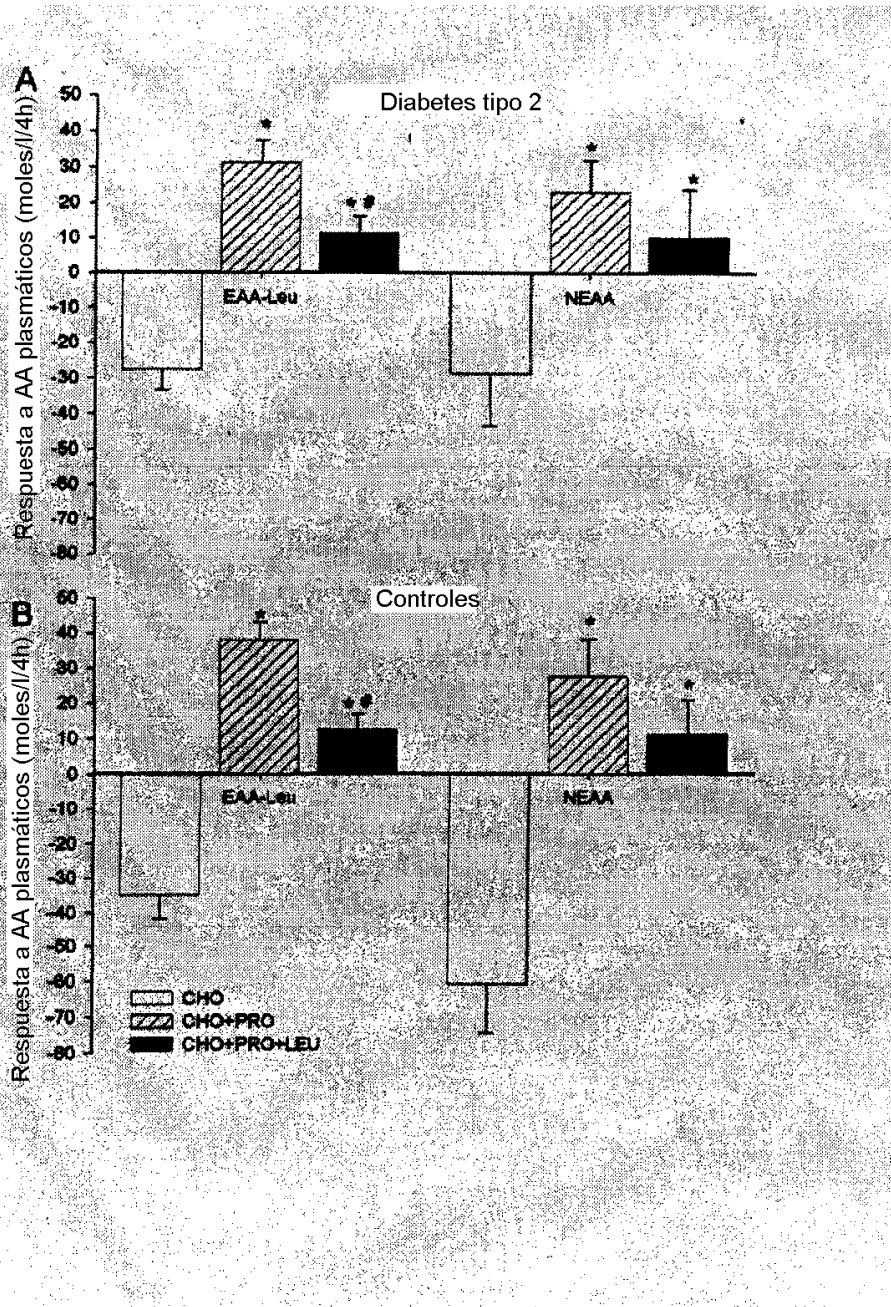


Fig. 3