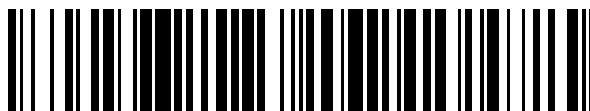


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 123**

51 Int. Cl.:
A61K 51/12 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03750103 .8**
96 Fecha de presentación: **09.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1503805**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2005**

54 Título: **ALIMENTO COMESTIBLE LIOFILIZADO QUE INCORPORA UN MARCADOR.**

30 Prioridad:
10.05.2002 US 379581 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.02.2012

73 Titular/es:
ADVANCED BREATH DIAGNOSTICS, LLC
105 WESTPARK DRIVE, SUITE 150
BRENTWOOD, TN 37027, US

72 Inventor/es:
BUSH, Kerry;
EVANS, Keith, Darrel y
KONOPKA, Stanley, John

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 375 123 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

Alimento comestible liofilizado que incorpora un marcador

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a una comida liofilizada (secada por congelación) que incluye un alimento comestible, un componente del cual incluye un marcador o fármaco y métodos de uso del mismo para administrar de manera fiable un marcador o fármaco a un mamífero y el uso de dicha comida para medir la absorción de los fármacos terapéuticos y diagnósticos o los marcadores a lo largo de una gama de comidas altamente estandarizadas. También se refiere a un método para validar una comida para su uso en métodos diagnósticos o de ensayo. Además, la comida se puede usar para medir las funciones corporales (fisiológicas) como resultado de la digestión, absorción y/o metabolismo de la comida y de su marcador o fármaco.

15 **Antecedentes de la invención**

La digestión de productos alimentarios consumidos comienza en la cavidad oral donde el alimento es roto mecánicamente por medio de la masticación, lubricado con la saliva y procesado enzimáticamente por medio de la amilasa presente en la saliva. La digestión continúa en el estómago donde el alimento experimenta licuefacción por parte de los jugos gástricos y enzimas secretadas por las células que revisten el estómago para producir el quimo. El quimo entra en el intestino delgado por medio del esfínter pilórico para el procesamiento posterior por parte de las sales biliares producidas por el hígado y las enzimas digestivas pancreáticas. Los componentes no absorbidos o transportados al interior del intestino delgado son sometidos a procesamiento posterior en el intestino grueso.

La tasa a la cual se desplaza el quimo hacia el intestino delgado (tasa de vaciado gástrico) es el producto de numerosos factores fisiológicos que incluyen, hormonas, señales químicas durante la ingesta, así como también señales desde el sistema nervioso.

Parte de la población se encuentra afectada por trastornos que afectan a la tasa de vaciado. Por ejemplo, cuando se acelera la tasa de vaciado, el alimento no digerido es liberado de forma prematura desde el estómago hacia el intestino delgado. Por el contrario, cuando la tasa se desacelera, se retarda el movimiento del alimento ingerido desde el estómago hasta el intestino, dando lugar a la condición denominada "vaciado retardado", conocida de otro modo como gastroparesis.

Típicamente, los trastornos que afectan a la tasa de vaciado gástrico se diagnostican mediante el seguimiento de la tasa con la cual la comida abandona el estómago y penetra en el intestino delgado. En estos ensayos, típicamente, se usa un alimento comestible para transportar un marcador al interior del intestino de un animal y se controla el vaciado gástrico por medio de un marcador.

Actualmente, el método rutinario para cuantificar el vaciado gástrico en humanos es la gammagrafía cuantitativa. La gammagrafía implica la ingestión de una comida que incluye al menos un alimento comestible, uno de cuyos componentes ha sido radiomarcado y la posterior medición de la emisión gamma por medio de una cámara de centelleo a medida que el alimento marcado es vaciado del estómago.

El tipo más común de comida empleada en la medición por gammagrafía del vaciado gástrico es una comida típicamente preparada mediante cocción de coloide de azufre de ^{99m}Tc de 0,5 mCi con dos huevos crudos o 120 gramos de sustitutivo de huevo líquido tal como el producto comercializado por ConAgra con el nombre comercial de Egg Beaker®. En el uso típico, el paciente ayuna la noche antes del ensayo. En el momento del ensayo el paciente consume el componente de huevo cocido radiomarcado con dos rebanadas de pan, 30 gramos de jamón y 120 ml de agua. El barrido de gammagrafía con cámaras anterior y posterior se lleva a cabo inmediatamente después de que se haya consumido la comida de ensayo y las exploraciones se obtienen cada 15 minutos durante dos horas y cada 30 minutos durante seis horas. Las mediciones de la gammagrafía de vaciado gástrico son directas, ya que la cámara mide directamente la comida que abandona el estómago.

En la medición del vaciado gástrico, existen dos parámetros que resultan clínicamente útiles. El primero, t_{LAG} , es el tiempo que se requiere para que el primer 10 % de alimento sea vaciado del estómago. El segundo, $t_{1/2}$ es el tiempo que se requiere para que la mitad de los contenidos sean vaciados del estómago. Se calcula el porcentaje de retención gástrica del radiomarcador en cada momento para generar una curva de retención gástrica de gammagrafía. La curva se modela matemáticamente con un modelo exponencial y los resultados de diagnóstico t_{LAG} y $t_{1/2}$ se pueden calcular a partir de la curva.

Varias desventajas están asociadas al método de gammagrafía tradicional. En primer lugar, es preciso someter al paciente a radioisótopos. Esto constituye particularmente un problema para mujeres en edad de procrear o niños. Además, el procedimiento debe llevarse a cabo en instalaciones especializadas de medicina nuclear. Finalmente, la preparación del procedimiento resulta problemática y potencialmente pueden introducir errores en el procedimiento

de ensayo. Antes del procedimiento, el personal debe preparar la comida marcada. Debido a que los parámetros de cocinado o la calidad alimentaria puede variar de un hospital a otro, existe pérdida de estandarización. Igual que en cualquier ensayo médico, la estandarización es de gran importancia en los procedimientos de ensayo de vaciado gástrico.

5 Recientemente, se ha descrito un método para medir el vaciado gástrico que utiliza un alimento comestible marcado con marcadores no radioactivos. A medida que el alimento comestible con marcadores no radioactivos es digerido, se produce un componente marcado que puede ser detectado en la respiración del paciente.

10 El método se describe con detalle en la patente de EE.UU. 5.707.602.

El documento WO-A-01/72342 describe un estuche para ensayo de vaciado gástrico en el que se prepara una comida de ensayo a partir de una premezcla en forma de polvo que comprende yema de huevo, que se encuentra marcada con ácido octanoico ^{13}C y clara de huevo. De este modo, la comida difiere de la materia objeto de la presente aplicación en que el marcador de ^{13}C no se encuentra unido a todo el huevo sino únicamente a la yema del huevo.

Esta patente describe el uso de un complemento nutricional, *Spirulina platensis*, un alga azul y verde, desarrollada en un medio de $^{13}\text{CO}_2$ altamente enriquecido. El carbono 13 actúa como marcador no radioactivo. Se cuece una pequeña cantidad de algas marcadas en el interior de un rodillo o barra de desayuno y son consumidas por un paciente con zumo o agua. Se tritura la comida en el estómago hasta un tamaño de partícula de aproximadamente 1-2 mm y posteriormente se hace pasar desde el estómago a través del píloro hacia el interior del intestino. En el intestino, los productos marcados de la digestión de *Spirulina platensis*- ^{13}C son absorbidos y metabolizados dando lugar a dióxido de carbono marcado expirado en la respiración. Se correlaciona la tasa de aparición de $^{13}\text{CO}_2$ en la respiración del paciente (tasa de excreción de $^{13}\text{CO}_2$) con la tasa de vaciado gástrico.

En contraste con la gammagrafía, la medición del vaciado gástrico, de acuerdo con el marcador descrito anteriormente, es indirecta. Por tanto, resulta deseable correlacionar matemáticamente la curva de excreción de $^{13}\text{CO}_2$ con la curva de retención gástrica de gammagrafía de forma que se pueda calcular el tiempo de vaciado del estómago a partir de la curva de $^{13}\text{CO}_2$. Por ejemplo, se puede usar un modelo lineal para desarrollar la relación entre los parámetros de diagnóstico obtenidos a partir de las mediciones de gammagrafía y los datos correspondientes obtenidos a partir de la tasa de excreción de $^{13}\text{CO}_2$ del paciente cuando se administran de forma simultánea tanto el marcado de gammagrafía radioactivo como el marcador de ^{13}C en la misma comida.

35 Para correlacionar de forma exacta al curva de excreción de $^{13}\text{CO}_2$ y la curva de desintegración radioactiva, resulta deseable estandarizar el alimento comestible y/o la matriz de comida que administra el marcador para reducir el número de variables. Por ejemplo, si se incorpora el nuevo marcador o fármaco (el sustituto) al alimento comestible y/o comida (comida de sustituto) que sea diferente del alimento comestible y/o comida (comida de predicado) en el que se incorpora el marcado bien aceptado o fármaco (predicado), el proceso de correlación puede ser muy difícil. De este modo, resulta deseable para las comidas de predicado y de sustituto que sean lo más similares posible en cuanto a composición, textura y contenido nutricional.

De forma similar, dicha estandarización permite la validación de nuevos ensayos médicos y diagnósticos frente a los ensayos aceptados y bien conocidos que garantizar exactitud y aceptación por parte de la comunidad científica. Esto puede ser particularmente importante cuando el nuevo ensayo detecta, evalúa y mide las características fisiológicas de manera diferente, por ejemplo, de forma indirecta con respecto a forma directa.

Además de la estandarización entre los ensayos médicos tradicionales y nuevos, resulta deseable que cada método sea estandarizado. Resulta deseable y con frecuencia esencial, que el ensayo médico se lleve a cabo de manera idéntica cada vez que se realice.

De este modo, es un objetivo de la presente invención garantizar la fiabilidad y la estandarización cuando se administra una comida combinada con un marcador o fármaco terapéutico al interior o más allá del estómago. Otro objetivo es proporcionar un método fiable para validar y medir la absorción y/o la actividad del fármaco o marcador.

55 Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la comida comprende huevos enteros unidos a una cantidad conocida de un marcador de ^{13}C procedente de biomasa, escogiéndose dicho marcador de ^{13}C de manera que cuando es ingerido por un mamífero con la comida es posible controlar bien la absorción o bien el metabolismo del marcador o fármaco y correlacionarlo con una función fisiológica del mamífero o con una cantidad terapéuticamente eficaz del marcador o fármaco administrada al mamífero y en el que tanto los huevos enteros como el marcador se encuentran liofilizados.

65 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, el método para producir el alimento comestible estandarizado marcado con un marcador comprende las etapas de proporcionar un marcador ^{13}C procedente de

biomasa; marcar todos los huevos con marcador ^{13}C y liofilizar el marcador ^{13}C y todos los huevos.

Descripción detallada de la realización preferida

5 El ensayo estandarizado de vaciado gástrico que es seguro, eficaz y que se puede usar fácilmente en una configuración clínica puede emplear un marcador estable tal como ^{13}C incorporado a la comida estandarizada preparada. Un sustitutivo de comida fácilmente reconstituible, marcado de manera uniforme de comida estandarizada secada por congelación garantiza un rendimiento fiable del ensayo para el que se ha preparado la comida. Los términos secado por congelación y liofilizado se usan en el presente documento de forma intercambiable.

15 La comida estandarizada sobre la que se incorpora el marcador puede ser cualquier tipo de alimento apropiado para consumo humano. Por ejemplo, las comidas típicas usadas para los ensayos de vaciado gástrico incluyen huevos revueltos e hígado. Como se apreciará por parte de los expertos en la técnica, se puede utilizar cualquier producto de alimento que sea susceptible al proceso de secado por congelación. Se pueden escoger productos de alimento para satisfacer necesidades especiales de la dieta de los pacientes, por ejemplo, vegetarianos o los que deseen alimentos procesados bajo estándares de Kosher.

20 En una realización, la comida estandarizada son huevos. Los métodos de gammagrafía tradicionales han proporcionado una comida que consiste en un sandwich preparado con huevos radiomarcados. Estudios recientes indican que la curva de excreción procedente de una comida marcada biológicamente se correlaciona con la curva de emisión gamma. Además, los huevos son susceptibles al proceso de secado por congelación y presentan un largo período de caducidad.

25 La comida o el componente alimentario comestible de la comida se pueden marcar con un isótopo biológicamente seguro y estable, tal como ^{13}C . Como podrá ser apreciado por partes de los expertos en la técnica, ^{13}C puede ser proporcionado a partir de una fuente que resulte apropiada para consumo humano. Por ejemplo, se puede mezclar ácido octanoico que incorpore ^{13}C con la comida o con el componente de alimento comestible de la comida. En una realización, la fuente de ^{13}C es *S. platensis*. Se pueden obtener algas que contienen ^{13}C mediante desarrollo de células de algas en un medio enriquecido con ^{13}C como se divulga en la patente de EE.UU. transferida legalmente N°. 6.872.516.

35 Se puede usar la comida estandarizada secada por congelación con un variedad de marcadores y se puede aplicar a una amplia variedad de tipos de comida y incorporar todos los tipos y cantidades exactas de marcadores, incluyendo las que se sintetizan directamente con un marcador de ^{13}C Carbono o las que proceden de biomasa tales como *S. platensis*- ^{13}C .

40 Con el fin de garantizar la exactitud de los resultados, el ^{13}C se distribuye de manera deseable y uniforme por toda la comida o su componente de alimento. En una realización, la comida o su componente y las algas de ^{13}C se liofilizan por separado. Posteriormente, se mezcla de manera uniforme una cantidad pre-medida de algas de ^{13}C con una cantidad pre-medida de huevo liofilizado para garantizar una distribución uniforme. De manera alternativa, se puede mezclar de manera uniforme una cantidad pre-medida de algas que contienen ^{13}C con una cantidad pre-medida de huevo antes de la liofilización. En esta realización, no se requiere preparación in situ más allá de la reconstitución y la cocción, si resultase necesario.

45 Como podrá ser apreciado por parte de los expertos en la técnica, la cantidad de algas o de otras fuentes de ^{13}C a añadir a la comida o a su componente depende de una variedad de factores que incluyen la forma de dosificación deseada, la cantidad de material de comida y la fuente de ^{13}C . Es evidente que se pueden producir de forma simultánea una pluralidad de comidas de acuerdo con el método de secado por congelación. Una vez que el marcador se ha distribuido de manera uniforme en la comida o en su componente, se pueden producir servicios individuales simplemente dividiendo el lote en peso, volumen o cualquier otra técnica apropiada, en servidos individuales.

55 Existen varias ventajas de usar el proceso de secado por congelación para preparar las comidas estandarizadas. Las comidas secadas por congelación proporcionan un vehículo para incorporar de forma fiable y exacta un marcador tal como un material de isótopo marcado estable o un fármaco en el interior de la matriz de alimento comestible. El marcado o fármaco se puede incorporar en el alimento comestible durante la preparación o en el momento en el que la comida vaya a ser reconstituida. Las comidas secadas por congelación también garantizan la estandarización de los ensayos a lo largo de todos los usuarios médicos y puntos de administración. Se pueden incorporar varios marcadores biológicos o fármacos, y sus combinaciones, y se pueden evaluar a partir de la misma matriz de comida. No se requiere refrigeración para las comidas secadas por congelación, lo que las convierte en más fáciles de almacenar y evita el deterioro.

65 Debe entenderse que la comida liofilizada para administración se puede utilizar para que incorpore de manera eficaz y exacta y para que administre cualquier marcador, isótopo o fármaco que no sea susceptible de degradación durante el proceso de liofilización de manera que el marcador o fármaco mantenga su actividad funcional una vez

que la comida haya sido reconstituida. Se puede usar el secado por congelación de una comida estándar en la que se puede incorporar un marcador o fármaco en un componente de la comida para administrar un marcador o fármaco para su uso en cualquier procedimiento médico, en el que se lleva a cabo una medición fisiológica tras la ingestión de un alimento comestible marcado por parte del paciente.

Se puede usar la comida secada por congelación estandarizada para evaluar el vaciado gástrico en pacientes o en sujetos de ensayo. Para utilizar la comida, el personal clínico simplemente reconstituye la comida pre-marcada antes del ensayo. Posteriormente, el paciente ingiere la comida incluyendo el marcador, por ejemplo, las algas marcadas. A medida que se vacía la comida hacia el intestino delgado del paciente, el ¹³C es absorbido y oxidado para dar ¹³CO₂. El ¹³CO₂ es excretado por medio de la respiración del paciente. Se toman muestras de respiración por medio de técnicas conocidas en la técnica, a intervalos de tiempo periódicos y se determina la cantidad de ¹³CO₂ en la muestra de respiración por medio de técnicas conocidas en la técnica.

Para obtener resultados exactos, el marcador debe permanecer unido a vehículo de administración, por ejemplo, al componente de alimento comestible. Si el marcado se desliga, se puede mover hacia delante del proceso de vaciado de fase sólida al interior de la fase líquida, pasando a través del píloro y hacia el interior del intestino de manera más rápida que la que representa al proceso de vaciado gástrico en curso. También puede pasar a través de la pared del estómago y penetrar en la circulación y en el proceso de metabolismo de manera que se produzca un aumento de señal de ¹³CO₂ no relacionado con el proceso digestivo que se pretende medir. De este modo, es importante garantizar que el proceso de fabricación no modifica la naturaleza de las materias primas hasta el punto de que se pierda la capacidad de enlace.

En los ensayos de diagnóstico que usan ¹³C, la cantidad de ¹³C administrada se debe conocer de forma exacta. En el ensayo de respiración, los resultados están basados en la cantidad producida de ¹³CO₂, que se encuentra directamente relacionada con la cantidad ingerida originalmente. Para determinar la dosificación actual de ¹³C, es necesario conocer el porcentaje en peso de carbono total, así como el porcentaje de ¹³C. Esto se muestra en la Tabla 1, que ilustra tres cantidades diferentes de dosificaciones objetivo de marcador de ¹³C para las especies de algas marcadas con ¹³C *S. platensis*. La cantidad de *S. platensis* marcada con ¹³C que se debe incorporar a la comida para lograr la dosificación objetivo de ¹³C se determina de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\text{Dosificación objetivo mg } ^{13}\text{C} / (\% \text{ Átomos de } ^{13}\text{C} \% \text{ Carbono}) = \text{mg } [^{13}\text{C}]\text{-}S. \textit{ platensis} \text{ distribuida}$$

La Tabla 1 proporciona varios ejemplos de como se emplea la ecuación. Esta ecuación es aplicable a moléculas marcadas con ¹³C o identidades mayores, tales como biomasa.

Tabla 1. Ejemplo de cálculos de distribución para conseguir los tres niveles objetivo de dosificación de ¹³C

Dosificación objetivo Mg ¹³ C	[¹³ C]- <i>S. p.</i> % Átomo de ¹³ C	[¹³ C]- <i>S. p.</i> % Carbono	[¹³ C]- <i>S. p.</i> mg	Tolerancia ± mg
80	0,95	0,42	200	20
40			100	10
20			50	5

Para *S. platensis*, generalmente el contenido de carbono es de aproximadamente 42 % y la incorporación de ¹³C de aproximadamente 95 %, como se muestra en la tabla anterior.

Ahora se puede llevar a cabo el estudio con un número suficiente de pacientes para establecer la dosificación apropiada a añadir a la comida estandarizada. Un ejemplo específico es llevar a cabo un estudio de cruzamiento prospectivo en el que se administra la misma comida a un grupo de pacientes nominales y a un grupo igual en número de pacientes con vaciado gástrico retardado conocido, 3 veces, en ocasiones por separado, siendo la comida igual para una dosificación diferentes de ¹³C como se prescribe en la tabla anterior. Se puede comparar el área bajo las curva de excreción de ¹³CO₂ a partir de los grupos de vaciado normal y retardado, a 3 niveles diferentes de dosificación, con objetivos estadísticos apropiados, para determinar la dosificación aceptables más baja que proporciona suficiente señal para evaluar el vaciado gástrico tanto normal como impedido (retardado) usando la comida deseada. Esto se puede conseguir de manera coherente estando presente la dosificación escogida.

En circunstancias en las que se modifica el marcador o la fuente del marcador y/o la comida o su componente, resulta deseable validar el nuevo marcador (sustituto) o el alimento. Para validar completamente el uso de dicho ensayo de respiración entre todas las poblaciones de pacientes apropiadas, es necesario correlacionar los resultados obtenidos con los resultados que se obtendrían usando el ensayo de gammagrafía. Las diferencias en el tipo de comida o marcador usado pueden dar lugar a tasas diferentes de vaciado gástrico y a diferentes huellas fisiológicas o metabólicas. Mientras que se puede establecer una relación matemática entre las dos comidas y la

- comida de sustituto puede convertirse en un agente de predicción fiable para $t_{1/2}$, aumenta el número de estudios necesario para validar la relación y es posible que no tenga lugar una relación coherente entre la comida de predicado y la comida de sustituto a lo largo de todas las poblaciones de pacientes si la composición de cada comida es considerablemente diferente. Por ejemplo, en los ensayos de vaciado gástrico, es posible que dos comidas diferentes o marcadores puedan presentar una relación matemática coherente y fisiológica en pacientes normales, pero quizás no en algunos pacientes afectados. Un número elevado de gastroparésicos (evacuación gástrica tardía) son diabéticos y los diabéticos pueden metabolizar comidas diferentes de manera tal que dan lugar a cierta inconsistencia en la relación predicha entre las dos comidas diferentes.
- 5
- 10 Simplemente mediante el ajuste del contenido de proteínas, carbohidratos y grasas de la comida de sustituto con respecto a la comida del predicado no se garantiza la consistencia fisiológica. El tipo de contenido de proteína, carbohidrato y contenido de grasa puede ser diferente, es decir, la proteína de la comida de huevo puede ser principalmente albúmina, mientras que el rodillo puede contener fundamentalmente proteína de soja. Además, la matriz que se une a los marcadores es diferente y pueden tener lugar pequeñas pero importantes diferencias en cuanto a trituración, absorción y metabolismo del marcador de sustituto o fármaco que afecten a la propia clasificación del paciente.
- 15
- Para mejorar la fiabilidad del proceso de validación, la comida de sustituto debe coincidir con la comida de predicado. Con el fin de que dicha comida de sustituto deseada para una amplia utilización ambulatoria resulte eficaz, segura y de fácil distribución debe ser consistente en cuanto a textura, composición y valor nutricional con respecto a la comida de predicado; presentar una relación fisiológica y metabólica coherente con la comida de predicado usada para determinar su eficacia; ser segura frente al deterioro y la desintegración; y presentar un período de caducidad comercialmente razonable antes de su utilización.
- 20
- 25 En una realización de la invención en la que se usa la comida para evaluar el vaciado gástrico, se pueden incorporar tanto el marcador ^{99m}Tc de predicado o la comida y el marcador de sustituto o la comida al interior de la misma matriz de comida. En este caso el marcador ^{99m}Tc debe añadirse a la matriz de comida en el punto de administración debido a su corta naturaleza de vida media radioactiva.
- 30
- 35 En una realización de la invención, se proporciona la comida de predicado como la comida pre-marcada estándar liofilizada descrita anteriormente. Tras reconstituir la comida de predicado, se añade el marcador de ^{99m}Tc de manera que la radiomarcador y el marcador de sustituto se unan en la misma matriz de alimento. Posteriormente, el paciente o sujeto de ensayo ingiere la comida marcada dual y se mide el vaciado gástrico de forma simultánea por medio del método de gammagrafía descrito previamente y del ensayo de respiración. Se comparan las dos mediciones obtenidas de este modo una frente a la otra y se correlaciona matemáticamente. Debido a que tanto el radiomarcador como el marcador de sustituto se incorporan a la misma matriz, esta realización permite la validación fiable de un tipo de comida de predicado o marcador de predicado.
- 40
- 45 Una ventaja de establecer un comida liofilizada apropiada para la introducción tanto de un marcador de predicado como de un marcador de sustituto es que se puede usar la comida para someter a ensayo dosificaciones diferentes de marcadores con el fin de asegurar que existe suficiente señal de marcador procedente de la comida para llevar a cabo la conclusión fisiológica o diagnóstica apropiada. Por ejemplo, antes de establecer una relación entre un marcador de predicado radioactivo establecido y un nuevo marcador de sustituto de ^{13}C no radioactivo, es preciso fijar la dosificación apropiada de ^{13}C a incorporar en la comida para proporcionar una tasa apropiada de excreción de $^{13}\text{CO}_2$ en el paciente. La señal debe ser medible de manera sencilla proporcionando datos fiables a partir de los cuales establecer la relación matemática entre el marcador de predicado y el marcador de sustituto.
- 50
- 55 De acuerdo con otra realización, tanto la comida de sustituto como la comida de predicado se preparan de acuerdo con el proceso de liofilización descrito anteriormente para preparar una comida de sustituto que coincida con la comida de predicado preparada de ese modo. En esta realización, se reconstituyen las comidas que presentan idénticos componentes de alimento comestible (es decir, el mismo alimento comestible en las mismas cantidades en cada comida, antes de la incorporación de cualquier marcador a la comida) que no contiene marcador y se añaden el marcador de predicado y el marcador de sustituto en el momento de la reconstitución. Se preparan tanto la comida de predicado como la comida de sustituto deseadas para someter a ensayo en estudios clínicos, con los mismos contenidos de pre-marcador y de la misma forma. De manera alternativa, si el marcador de sustituto es estable, es decir, capaz de mantener su actividad funcional, se puede añadir a la comida antes de la liofilización. Debido a que se comparan dos comidas, el paciente o sujeto de ensayo ingiere cada comida en momentos diferentes y se correlacionan los resultados matemáticamente.
- 60
- 65 El desarrollo de una comida de sustituto que se puede usar para validar de forma fiable el uso de un marcador de sustituto o fármaco que es similar en cuanto a textura, composición y valor nutricional a la comida de predicado y que se puede incorporar fácilmente al sistema de administración/comida disponible comercialmente, permite la sustitución de marcadores no radioactivos estables por marcadores radioactivos en las comidas de ensayo. De este modo, a l hora de evaluación las condiciones fisiológicas tales como motilidad gástrica en mujeres en edad de procrear y en niños en los que la exposición a la radiación resulta no deseable, se pueden usar marcadores no radioactivos y estables.

Se puede realizar una multitud de evaluaciones usando los marcadores de vaciado gástrico descritos en el presente documento tales como las comparaciones de marcador de predicado y marcador de sustituto, medición de la variación de motilidad gástrica intra-pacientes, comparaciones inter-pacientes y similares.

De manera ideal, se preparan los alimentos comestibles del sustituto, predicado, o las comidas usadas en el diseño clínico de la invención, en un alimento controlado y/o entorno de fabricación farmacéutico que satisface los estándares reguladores apropiados, con estabilidad de envasado a largo plazo y con técnicas de re-constitución sencillas y fiables. La preparación de estas comidas en un entorno de fabricación de este tipo garantiza que las materias primas de las comidas no se preparan de forma aleatoria en el punto de administración del ensayo, lo que puede conducir a imprecisiones. Por ejemplo, pueden surgir inconsistencias de un punto a otro, debido a las diferencias en el tipo de suministro de ultramarinos, diferencias en los métodos y tiempos de cocinado, y en las técnicas de administración de ensayos. Además, el uso de un proceso de fabricación para preparar alimentos comestibles resulta beneficioso ya que permite no solo la producción de una comida más "estandarizada", sino también un amplio uso comercial de los alimentos comestibles con un marcador biológico apropiado o fármaco. Para esas comidas que deben ser cocinadas en el punto de ensayo, es mejor que se aplique el mismo método de cocinado a la comida de predicado y a la comida de sustituto para minimizar la incertidumbre.

La comida estandarizada secada por congelación de la invención puede servir como modo de administración estandarizado para fármacos terapéuticos. De manera similar, se puede usar un grupo de comidas estandarizadas secadas por congelación de la invención para estudiar la absorción de varios fármacos de diagnóstico y/o terapéuticos con composiciones de comida variantes. Además, se puede usar una comida estandarizada secada por congelación que incorpore marcadores y/o fármacos terapéuticos y diagnósticos para los estudios con animales en los que es preciso administrar los componentes de alimento, la dosificación del marcador o fármaco y una cantidad de alimento en peso con un control fiable. En una realización de la invención, una vez que se ha establecido la comida de sustituto con su marcador de sustituto o fármaco como útil a modo de comparación con la comida de predicado con el marcado de predicado o fármaco, el secado por congelación de los componentes de alimento comestibles de la comida garantiza no solo la estabilidad de la comida sino también la reproducibilidad de los resultados de ensayo obtenidos con dichas comidas estandarizadas.

Mientras que varias realizaciones descritas en el presente documento muestran el uso de un método de secado por congelación para preparar alimentos comestibles de las comidas, resulta evidente para el experto en la técnica que se puede usar cualquier método que garantice que la comida de sustituto sea idéntica en cuanto a composición a la comida de predicado. Por ejemplo, se pueden preparar los componentes de alimento comestible cocinando los componentes comestibles en el interior de un rodillo o galleta de acuerdo con un proceso estandarizado se puede incorporar el marcador de predicado o fármaco y el marcador de sustituto o fármaco a la comida durante un proceso de fabricación controlado o en el punto del ensayo.

A continuación, se describe más la invención haciendo referencia a los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de comidas de huevo estandarizadas pre-marcadas con ^{13}C .

Se mezclaron de forma homogénea 207,41 kg (cantidad requerida para preparar 2.000 comidas) de fórmula de líquido de huevo entero des-azucarado y pasteurizado que contenía huevos, agua, lecho seca no grasa, sal y aromatizantes de ahumado con 200 g de *S. platensis* marcadas con ^{13}C que contenían 95 % de átomos de ^{13}C y 42 % de carbono total. Se calculó la cantidad de formulación de huevo líquida necesaria para producir un número específico de comidas de 28 g a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{(Cantidad de unidades)} \times (28 \text{ g}/0,27) = \text{gramos de formulación líquida de huevo.}$$

La cantidad necesaria de algas marcadas depende del porcentaje de ^{13}C presente en las células de algas y se calculó a partir de la ecuación siguiente:

$$^{13}\text{C} / (\% \text{ de átomos de } ^{13}\text{C} \times \% \text{ de carbono}) = \text{mg } [^{13}\text{C}] - \text{S. platensis}$$

Se calculó la cantidad total de algas marcadas requerida por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Número de dosificaciones} \times \text{mg } [^{13}\text{C}] - \text{S. platensis} / \text{dosificación}$$

Se bombeó la formulación de huevo líquida que contenía la cantidad apropiada de marcados mezclado de forma homogénea sobre bandejas de liofilización de aluminio anodizadas y enfriadas y se liofilizó durante 24 horas con una temperatura inicial de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una temperatura final de $48\text{ }^{\circ}\text{C}$, a una presión < 200 micrómetros, para satisfacer una especificación de pérdida durante el secado (LOD) $< 3,0\%$ del contenido de humedad. Se dividió la mezcla resultante marcada y secada por congelación para producir 2.000 unidades de comidas de peso y distribución de marcador uniformes.

Ejemplo 2: Confirmación de la distribución uniforme de marcador

Se tomaron diez muestras de ensayo de forma aleatoria de aproximadamente los puntos de comienzo, medio y final del proceso de molienda a partir de un operación de fabricación que se preparó para producir unidades que contenían cada una 6 mg de ^{13}C procedente de [^{13}C]-S. *platensis*. Se analizó una alícuota de cada muestra en una cámara de combustión unida a un espectrofotómetro de masas con proporción isotópica y se comparó con un estándar de ^{13}C conocido.

Las muestras presentaron una recuperación media de 6,01 mg por muestra, una desviación estándar de 0,072 y un % de desviación estándar relativa de 1,19 %. Estos resultados demuestran que el marcador de ^{13}C se distribuyó uniformemente en la matriz de comida.

Ejemplo 3: Confirmación de la distribución uniforme de marcador en las comidas preparadas in-situ

En algunos casos puede resultar deseable proporcionar la comida secada por congelación y el marcador de forma separada de manera que el marcador se pueda mezclar con la comida justo antes de ser usado. No obstante, la distribución uniforme del marcador permanece de importancia considerable.

Para determinar si la mezcla manual in-situ proporciona una distribución uniforme aceptable del marcador, se secó por congelación una cantidad de [^{13}C]-S. *platensis* y formulación de huevo líquida por separado como se ha descrito anteriormente. Se rehidrató una alícuota de 50 mg de [^{13}C]-S. *platensis* seca en 5 g de agua en un frasquito de vidrio de 200 ml con un tapón de rosca revestido con teflón durante 10 minutos y se añadió a 28 g de polvo de huevo. Se usaron 88 g de agua para enjuagar el contenido del frasquito de rehidratación y pasarlo a la mezcla de huevo, se tapó el recipiente de mezcla y se agitó vigorosamente durante 1 minuto. Se cocinó la mezcla de huevo en un microondas durante 1,5 minutos, se dejó enfriar y se separó en 6 muestras. Se llevó a cabo la preparación de comida anterior por triplicado.

Se secaron cada una de las 6 rebanadas de cada una de las 3 comidas y se sometieron a tratamiento con mortero y pie para dar lugar a muestras uniformes. Se retiró una alícuota de cada muestra, se sometió a combustión y se sometió a ensayo por medio de espectrometría de masas con proporción de isótopo gaseosa y se determinó la cantidad de ^{13}C mediante comparación con un estándar conocido.

El % de desviación relativa estándar a lo largo de las 6 muestras a partir de cada una de las 3 comidas fue de 5,2 %, 3,4 % y 3,3 %, respectivamente. Estos resultados demuestran que la mezcla in-situ produjo comidas con un marcador distribuido de manera uniforme.

Ejemplo 4: Evaluación de la capacidad de unión

Se reconstituyeron 28 g de polvo de huevo liofilizado que contenían una cantidad de marcador- ^{13}C con 93 g de agua, se mezclaron y se cocinaron. Se enfrió la comida cocinada, se pesó y se prensó a través de una criba de 4 mm en el interior de un recipiente de recogida. Se recogieron muestras de diez gramos, se secaron durante la noche a 105 °C y se molieron usando un mortero y mano para dar lugar a un polvo fino. Se sometió a combustión la mezcla seca y se sometió a ensayo por medio de espectrometría de masas con proporción de isótopo gaseosa.

Se dividió ochenta por ciento de la parte de la comida de huevo que permaneció en el recipiente tras el procedimiento de detección para dar lugar a 2 cantidades iguales y se sometieron a digestión *in vitro*. Se preparó fluido gástrico U.S.P. disolviendo 2,0 g de NaCl_2 y 3,2 g de pepsina purificada procedente de mucosa estomacal de porcino con una actividad de 800-2500 unidades/mg de proteína en 7,0 ml de ácido clorhídrico. Se llevó el volumen hasta 1 l con agua y se llevó el pH hasta aproximadamente 1,2.

Se incubaron partes de comida de huevo en 100 ml de la disolución gástrica preparada a 37 °C durante 30 minutos con agitación constante a una tasa fija de 200 ± 20 rpm usando un aparato de paletas de acero inoxidable colocado aproximadamente a 0,25 pulgadas de la parte inferior del matraz. Tras la digestión, se vertieron los contenidos de cada matraz sobre un conjunto de cribas apiladas de 4 mm, 2 mm y 1 mm y se enjuagó con agua fría del grifo durante 1 minuto a una caudal de aproximadamente 4 l/min y se dejó drenar la pila de cribas durante 5 minutos.

Se registró el peso de la comida digerida restante sobre cada criba y se aisló en recipiente de muestra de aluminio tarado. Se secaron al aire las muestras durante la noche a 105 °C para retirar el exceso de agua. Se analizó el contenido de ^{13}C de una alícuota de muestra de 1 mm (representativa del tamaño más pequeño que alcanza la partícula de alimento después del proceso completo de trituración) por medio de combustión y ensayo de espectrometría de proporción de masas y se comparó con las cantidades de ^{13}C de pre-digestión. Se calculó el porcentaje de unión de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\left(\text{contenido de } ^{13}\text{C} \text{ por gramo de comida pos-digerida de carbono} \right) / \left(\text{contenido de } ^{13}\text{C} \text{ por gramo de comida pre-digerida de carbono} \right) \times 100$$

El porcentaje de unión fue de 100 % en las muestras digeridas de 1 mm en comparación con las muestras pre-digeridas, con una pérdida de 51 % de la masa de huevo total durante la digestión *in vitro*.

- 5 Mientras que se han descrito realizaciones preferidas de la presente invención, debe entenderse que se pueden llevar a cabo varios cambios, adaptaciones y modificaciones en la misma sin que ello suponga apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una comida que comprende huevos enteros, en la que los huevos enteros se encuentran unidos a una cantidad conocida de marcador de ^{13}C procedente de biomasa, escogiéndose dicho marcador de ^{13}C de forma que cuando es ingerido por un mamífero con la comida, se puede llevar a cabo el control de la absorción o del metabolismo del marcador o fármaco y se puede correlacionar con una función fisiológica del mamífero o con una cantidad terapéuticamente eficaz del marcador o fármaco administrada al mamífero y en la que tanto los huevos enteros como el marcador se encuentran liofilizados.
- 10 2. La comida de la reivindicación 1, en la que la biomasa es *Spirulina platensis* enriquecida con ^{13}C .
3. La comida de la reivindicación 2, en la que *Spirulina platensis* enriquecida con ^{13}C se liofiliza por separado de la comida de manera que se puede añadir el marcador a la comida después de que la comida se haya sido reconstituida.
- 15 4. La comida de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el marcador de ^{13}C se añade a la comida antes de liofilizar la comida.
- 20 5. La comida de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el marcador se distribuye uniformemente por todos los huevos enteros.
6. La comida de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el marcador se une a los huevos enteros de manera que durante la trituración es el estómago del mamífero considerablemente todo el marcador permanece unido a los huevos enteros.
- 25 7. La comida de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, envasada en una forma de dosificación unitaria.
8. Un método para producir un alimento comestible estandarizado marcado con un marcador que comprende las etapas de:
- 30 proporcionar un marcador de ^{13}C procedente de biomasa;
 marcar huevos enteros con el marcador de ^{13}C ; y
 liofilizar el marcador de ^{13}C y los huevos enteros.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, en el que la biomasa es *Spirulina platensis*.
10. El método de la reivindicación 9, en el que *Spirulina platensis* se desarrolla en un entorno enriquecido con ^{13}C .
- 40 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que además incluye la etapa de distribuir de manera uniforme una cantidad conocida de marcador de ^{13}C en los huevos enteros antes de la liofilización.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el marcador de ^{13}C y los huevos enteros se liofilizan por separado.
- 45 13. El método de la reivindicación 12, en el que una cantidad conocida de marcador de ^{13}C liofilizado se distribuye de manera uniforme en una cantidad conocida de los huevos enteros liofilizados.