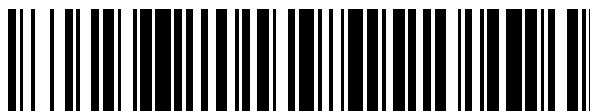


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 860**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 31/202 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 3/14 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

A61K 31/702 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

A61K 38/02 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2010 E 10726616 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2435039**

54 Título: **Combinación de una fuente de leucina y una fuente de ácido graso ω -3 insaturado para uso en el tratamiento de hipercalcemia**

30 Prioridad:

27.05.2009 WO PCT/NL2009/050297

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

11.01.2016

73 Titular/es:

**N.V. NUTRICIA (100.0%)
Eerste Stationsstraat 186
2712 HM Zoetermeer, NL**

72 Inventor/es:

**VAN NORREN, KLASKE;
FABER, JOYCE;
VAN HELVOORT, ADRIANUS LAMBERTUS
BERTHOLDUS y
HAGEMAN, ROBERT JOHAN JOSEPH**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 555 860 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

Combinación de una fuente de leucina y una fuente de ácido graso ω -3 insaturado para uso en el tratamiento de hipercalcemia

5 La invención se relaciona con una combinación específica de por lo menos dos componentes para el tratamiento de hipercalcemia, para reducir o evitar una reducción en la densidad mineral ósea en un sujeto, o para regular in vivo la homeostasis de calcio en plasma sanguíneo.

10 El calcio cumple una función vital en muchas funciones fisiológicas diferentes, especialmente en el traslado de estímulos de excitación de tejidos neurológicos y musculares. Adicionalmente, el calcio está involucrado en las rutas de transducción de señales que por ejemplo, pueden dar como resultado cambios en los equilibrios hormonales (por ejemplo, en el equilibrio de colecistoquinina). En individuos saludables, se regula de forma estricta la concentración de la homeostasis de calcio en plasma y se mantiene dentro de límites estrechos (entre 8.4 y 10.2 mg/dL o 2.1 y 2.6 mM) por la hormona paratiroide, la vitamina D y la calcitonina (véase "Strassman et al. (1993). Mechanisms of paraneoplastic syndromes of colon-26: involvement of interleukin 6 in hypercalcaemia. Cytokine., 5, 463-8").

15 La hipercalcemia se define a niveles de calcio en plasma por encima de 2.8 mmol/L en hombres o por encima de 2.5 mmol/L en mujeres (Bradley & Hoskin, 2006, Hypercalcaemia in head and neck squamous cell carcinoma. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg., 14, 51-4).

20 Los síntomas observados en pacientes hipercalcémicos se relacionan con la función fisiológica y neuro/muscular de calcio e incluyen: fatiga, náusea, vómito, estreñimiento, deterioro mental, falla renal, coma, cefalea y aparato sensorial alterado. La hipercalcemia se presenta más comúnmente en asociación con trastornos malignos o hiperparatiroidismo primario. Un porcentaje considerable de pacientes con neoplasmas, por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de riñón, leucemia linfoblástica, cáncer de mieloma múltiple o cáncer de cabeza y cuello desarrollan hipercalcemia.

25 Existe por lo menos dos diferentes formas de enfermedades malignas asociadas con hipercalcemia. Una está asociada con la disolución del hueso al invadir la metástasis (Berenson, J.R., Rajdev, L. & Broder, M. (2006). Managing bone complications of solid tumours. Cancer Biol Ther., 5, 1086-9. Epub 2006 Sep 20.). La otra forma se ha asociado con varios mecanismos diferentes que conducen al aumento de la descomposición del hueso. Uno de estos mecanismos incluye la secreción de la hormona relacionada con PTH (PTHrH) por el tumor, que puede llevar a aumento de la desmineralización ósea y/o a aumento de reabsorción renal de calcio, debido a la reacción cruzada del PTHrH con el receptor de PTH. Pero también se ha reportado que las citocinas inflamatorias están involucradas en la inducción de hipercalcemia (Mitnick, M., Isales, C., Paliwal, I. & Insogna, K. (1992). Parathyroid hormone-related protein stimulates prostaglandin E2 release from human osteoblast-like cells: modulating effect of peptide length. J Bone Miner Res., 7, 887-96).

35 Se ha reportado que los niveles de calcio en sangre son un factor de predicción independiente de la calidad de vida en pacientes con mieloma múltiple. Más aún, se ha reportado una correlación entre los niveles de calcio y las calificaciones de funcionamiento físico de estos pacientes. A parte de la fatiga, se han reportado otros parámetros de la calidad de vida que están correlacionados con los niveles de calcio. Se reporta una relación significativa entre el calcio y la pérdida del apetito en el diagnóstico. Más aún, se relaciona el calcio en suero con náuseas y vómito. Se menciona como un factor de predicción del dolor y se sugiere una relación con la función cognitiva.

40 El calcio en el suero es un factor de predicción independiente de la calidad de vida en mieloma múltiple (Eur J Haematol., 78,29-34. Epub 2006 Oct 13.). El nivel de calcio en sangre es un factor de predicción independiente de la calidad de vida en el mieloma múltiple. En este estudio, 32% de los 686 pacientes eran hipercalcémicos. Además, se reportó que existe un componente lineal en la correlación de calcio con las calificaciones de calidad de vida, fatiga y funcionamiento físico. Estos hallazgos indican que también elevaciones moderadas de los niveles de calcio dentro de niveles que se aceptan como variaciones normales, pueden contribuir a la fatiga relacionada con cáncer y a las reducciones relacionadas con cáncer en el desempeño físico.

45 Se ha observado que aún dentro de los rangos normales del calcio, se asocia el calcio en suero con la resistencia a insulina y que pequeñas elevaciones dentro del rango normal de los niveles de calcio pueden contribuir al desarrollo de diabetes. La resistencia a la insulina es el problema principal en diferentes clases de enfermedades crónicas tales como COPD, VIH, Alzheimer, cáncer, falla renal, falla cardíaca, y un estado de enfermedad caracterizado por un alto nivel en plasma y/o en suero de citoquinas proinflamatorias.

Adicionalmente, el tratamiento de pacientes que sufren de un trastorno diferente de hipercalcemia con medicamento puede provocar o empeorar la fatiga, el mal funcionamiento físico o mal funcionamiento mental. Por ejemplo, se utilizan ampliamente antraciclinas para tratar tumores sólidos y enfermedades malignas hematológicas. Los pacientes que sufren de estos tipos de cánceres también están en riesgo de desarrollar hipercalcemia (Higdon, M.L. & Higdon, J.A.

(2006). Treatment of oncologic emergencies. Am Fam Physician., 74, 1873-80). Los efectos directos de la doxorubicina, antraciclina, en la homeostasis de calcio en el músculo esquelético pueden contribuir a fatiga inducida por quimioterapia (van Norren, K. et al. (2009), "Direct effects of doxorubicin on skeletal muscle contribute to fatigue" Br J Cáncer., 100,311-4.). Por lo tanto, el grupo de pacientes que sufre de tumores sólidos y de enfermedades malignas hematológicas y que se trata con antraciclinas u otra forma de quimioterapia, puede ser aún más susceptibles a agotamiento sostenido como resultado de función muscular deteriorada debido a niveles elevados de calcio. También la irradiación puede aumentar o iniciar la descomposición ósea.

El documento WO 01/60355 se relaciona con el uso de compuestos que son un activador de o un ligando a, receptores activados por proliferador de peroxisoma para el tratamiento o profilaxis de enfermedad ósea, por ejemplo, un cáncer que da como resultado hipercalcemia. Entre dichos compuestos se mencionan una serie de ácidos grasos insaturados, que aparentemente pueden contribuir a la actividad anabólica ósea. Sin embargo, no se muestran resultados experimentales específicamente dirigidos al tratamiento de sujetos que sufren de hipercalcemia. En particular, no se muestra ni se sugiere un efecto de los ácidos grasos insaturados en los niveles de calcio en plasma.

Los inventores han encontrado que el uso de ácido graso insaturado (en un aceite vegetal, aceite de pescado o una mezcla de estos) solo puede ser insuficiente para tener un efecto significativo en los niveles de calcio en plasma en ratones que tienen tumor, véase los ejemplos adelante. Adicionalmente, no se observó un efecto significativo del ácido graso insaturado (en un aceite vegetal, aceite de pescado o una mezcla de estos) solo en una reducción del catabolismo óseo (que da como resultado un aumento en la densidad ósea) en ratones.

Es un objetivo de la invención proporcionar un medio novedoso para tratar hipercalcemia, en particular un medio que permitiría la reducción del nivel de calcio en plasma en un sujeto que sufre de hipercalcemia o el mantenimiento del nivel en plasma sanguíneo a un nivel normal, en un paciente que tiene el riesgo de desarrollar hipercalcemia y/o que permitiría evitar o reducir la pérdida de densidad ósea asociada con hipercalcemia y/o aliviar uno o más síntomas diferentes asociados con hipercalcemia, por ejemplo fatiga, función muscular reducida.

Uno o más objetivos adicionales que subyacen a la presente descripción serán evidentes a partir de la descripción adelante.

Ahora se ha encontrado que una combinación de un ácido graso insaturado específico y otro componente específico es útil para tratar de forma profiláctica o terapéutica la hipercalcemia.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención se relaciona con una combinación de una fuente de leucina y por lo menos un ácido graso ω -3-poliinsaturado, para uso en un tratamiento profiláctico o terapéutico de hipercalcemia, en donde la combinación es para uso en el tratamiento de un sujeto que sufre de un cáncer.

Adicionalmente, la invención se relaciona con una combinación de una fuente de leucina y una fuente de ácido graso ω -3-poliinsaturado, para uso en la reducción de la densidad mineral ósea en un sujeto o para el uso en la prevención de una reducción o para regulación in vivo de homeostasis de calcio en plasma sanguíneo, en donde dicho sujeto es un sujeto que sufre de cáncer.

Adicionalmente, la invención se relaciona con una composición nutricional, una composición farmacéutica o una composición nutracéutica que comprende una combinación de leucina y por lo menos un ácido graso ω -3-poliinsaturado para un uso de acuerdo con la invención.

En una realización específica, la combinación o composición para uso de la invención es para tratamiento profiláctico o terapéutico de liberación excesiva de calcio del hueso y/o músculo esquelético; y/o acumulación excesiva de calcio debido a falla renal o hiperparatiroidismo. Esta acumulación o liberación excesiva se puede asociar con fatiga, cansancio, pérdida de iniciativa, pérdida de función muscular, arritmia cardíaca, osteopenia, osteoporosis, enfermedades óseas, náusea, vómito o pérdida de apetito, y puede dar como resultado poliuria, oligouria y daño renal.

La invención, el nivel de calcio en plasma sanguíneo no tiene que llevar a una reducción a un nivel normal de calcio, en todas las circunstancias. Por ejemplo, los niveles de calcio se pueden llevar a o mantener a un valor normal o un valor ligeramente elevado (hasta aproximadamente 2.8 mM en humanos), por lo que se puede evitar la ocurrencia de una emergencia médica debido a hipercalcemia severa (nivel de calcio en plasma sanguíneo que excede 3.75 mM), lo que puede dar como resultado un estado de coma o paro cardíaco.

Adicionalmente, también en el caso durante o después del tratamiento el nivel de calcio no se normaliza completamente por el tratamiento con una combinación o composición de acuerdo con la invención, el sujeto puede beneficiarse de uno o más efectos ventajosos, tales como función muscular mejorada (por ejemplo, mayor fuerza máxima), menos fatiga, aumento en la actividad física, caquexia reducida, y/o afrontar uno o más de los síntomas como náusea, vómito, estreñimiento, deterioro mental, falla renal, cefalea, aparato sensorial alterado, pérdida de apetito.

Leyenda para las Figuras

La Figura 1 muestra el efecto de leucina, ácido graso ω -3-poliinsaturado (de aceite de pescado) o la combinación de estos en la densidad mineral ósea y los niveles de calcio en plasma. C= control, TB= ratones que tienen tumor que reciben dieta de control, leu= leucina, fo= aceite de pescado.

5 La Figura 2 muestra el efecto de la combinación específica total de leucina, (parte unida en proteína, parte en forma libre), ácido graso ω -3-poliinsaturado (de aceite de pescado) y oligosacáridos en los niveles de calcio en plasma. CON = ratones que reciben dieta B de control, TB-CON = ratones que tienen tumor que reciben dieta B de control, TB-SNC = ratones que tienen tumor que reciben la combinación nutricional específica.

10 La Figura 3 muestra correlaciones de los parámetros de función muscular con los niveles de calcio. Las etiquetas de datos representan un factor R de correlación Pearson con $p < 0.05$. Un punto de datos representado como una etiqueta abierta (velocidad de relajación/mg, 83 Hz) tiene un valor p de 0.057. $\text{Contr}2^*$ relajación/mg = la raíz cuadrada del tiempo de contracción corregida para la masa muscular multiplicada por la velocidad de correlación máxima corregida para la masa muscular.

15 La Figura 4 muestra ejemplos representativos de curvas de fuerzas individuales (la curva de animales con datos, de fuerza máxima que se ajustan mejor a la curva de la media). CON = ratones que reciben dieta B de control, TB-CON = ratones que tiene tumor que reciben dieta B de control, TB-SNC = ratones que tienen tumor que reciben la combinación nutricional específica.

20 La Figura 5 muestra la medición de la fatiga durante estimulación repetitiva, un modelo que imita el ejercicio. Los datos presentados son: pérdida acumulada por 10 repeticiones en fuerza muscular máxima corregida dividida por la fuerza muscular máxima corregida de masa en la repetición 1.

25 La Figura 6 muestra la distribución de la pérdida relativa en la fuerza máxima durante la estimulación repetitiva, un modelo que imita el ejercicio. Los datos presentados son: fuerza muscular máxima corregida en repetición de veces x - fuerza máxima en repetición de veces (x-20) dividida por la fuerza muscular máxima corregida de masa en la repetición 1. CON = ratones que reciben dieta B de control, TB-CON = ratones que tiene tumor que reciben dieta B de control, TB-SNC = que tienen tumor.

La Figura 7 muestra las correlaciones de parámetros de función muscular durante el ejercicio con niveles de calcio. Las etiquetas de datos representan un factor R de correlación Pearson con $p < 0.05$. Dos puntos de datos representados como marcas abiertas (velocidad de relajación/mg y ftr ambos a 83 Hz) tiene un valor p de 0.077 y 0.074 respectivamente.

30 La Figura 8 muestra actividad diaria por ratón en comparación con la actividad por ratón en el día 2. CON = ratones que reciben dieta B de control, TB-CON = ratones que tiene tumor que reciben dieta B de control, TB-SNC = ratones que tiene tumor que reciben la combinación nutricional específica.

El término "o" como se utiliza aquí significa "y/o" a menos que se especifique lo contrario.

El término "un" o "una" como se utiliza aquí significa "por lo menos uno" a menos que se especifique lo contrario.

35 Cuando se refiere a un "nombre" (por ejemplo, un compuesto, un aditivo, etc.), en singular, significa que se incluye el plural, a menos que se especifique lo contrario.

40 Cuando se refiere a "una combinación de una fuente de leucina y una fuente de ácido graso ω -3-poliinsaturado" para un propósito específico significa que tanto la leucina (proporcionada por esa fuente de leucina) como el ácido graso ω -3-poliinsaturado (proporcionado por esta fuente de ácido graso ω -3-poliinsaturado) están destinados a ser utilizados para este propósito en combinación. La fuente de leucina y la fuente de ácido graso ω -3-poliinsaturado se pueden administrar conjuntamente en una formulación única (tal como un alimento, una composición nutracéutica o farmacéutica), administrar simultáneamente en formulaciones separadas o posteriormente en formulaciones separadas. Si se administran posteriormente, las formulaciones usualmente se administran brevemente una después de la otra, es decir, en el caso de administración oral/entérica, la última formulación administrada entonces se administra usualmente antes de que se haya absorbido por el cuerpo la anterior formulación administrada.

50 En principio, una combinación o composición para uso de acuerdo con la invención se puede utilizar para el tratamiento de cualquier vertebrado, en particular cualquier mamífero, más en particular cualquier humano. El sujeto puede ser macho o hembra. El sujeto puede ser un niño, un adolescente o un adulto. Se puede diagnosticar hipercalcemia de una manera conocida per se, al determinar el nivel de calcio en el plasma sanguíneo. Como se indicó anteriormente, se considera que un humano macho es hipercalcémico en niveles de calcio en plasma por encima de 2.8 mmol/L, un humano hembra se considera que es hipercalcémica en niveles de calcio en plasma por encima de 2.5 mmol/L.

En una realización específica, la combinación o composición es para el tratamiento de una persona de edad avanzada. A este respecto, se afirma que en el contexto de esta solicitud, una persona de edad avanzada es un humano de 50 o más años de edad, en particular de 55 años o más, más en particular de 60 años o más, más en particular de 65 años o más. Esta definición más bien amplia tiene en cuenta el hecho que la edad promedio varía entre diferentes poblaciones, en diferentes continentes, etc. Los países más desarrollados del mundo han aceptado la edad cronológica de 65 años como una definición de una persona “de edad avanzada” o vieja (asociada con la edad a la cual se empieza a recibir los beneficios de pensión), pero al igual que muchos conceptos occidentalizados, esto no se adapta bien, por ejemplo a la situación en África. En la actualidad, no existe un criterio numérico estándar de las Naciones Unidas (ONU), pero el corte de acuerdo con la ONU es de más de 60 años para referirse a la población de edad avanzada en el mundo occidental. Las definiciones africanas más tradicionales de una persona de edad avanzada o “vieja” se correlacionan con las edad cronológicas de 50 a 65 años, dependiendo del ambiente, la región y el país.

En principio, se puede tratar cualquier forma de hipercalcemia en un sujeto que sufre de cáncer de acuerdo con la invención, en particular hipercalcemia por lo menos parcialmente provocada por liberación excesiva de calcio del esqueleto y/o por excreción reducida de calcio renal.

El sujeto que se va a tratar con una combinación o composición de acuerdo con la invención puede sufrir de hipercalcemia (en cuyo caso el tratamiento se puede referir como “terapéutico”), o el sujeto se puede tratar con el fin de evitar que desarrolle un estado hipercalcémico o por lo menos reducir uno o más síntomas que resultan de hipercalcemia, si ésta se desarrolla después completamente. Un tratamiento profiláctico puede en particular ser útil para cualquier sujeto que tenga un riesgo serio de desarrollar hipercalcemia. Existe un riesgo serio para sujetos que sufren de un trastorno o afección, en donde se sabe que la hipercalcemia se desarrolla (estadísticamente) en casos considerables.

Se contempla que también en particular los sujetos tratados con quimioterapia o radioterapia, por ejemplo, con una antraciclina, también pueden beneficiarse de un tratamiento con una combinación o composición de la invención.

El cáncer en particular se puede seleccionar del grupo de neoplasmas. Más en particular, el cáncer se puede seleccionar de cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de mieloma múltiple, y cáncer de cabeza y cuello. Adicionalmente, en particular, los pacientes que sufren de una enfermedad maligna hematológica (mieloma múltiple, linfoma, leucemia), trastornos relacionados con vitamina D que pueden dar como resultado hipercalcemia (hipervitaminosis D), trastornos/afecciones relacionadas con altos índices de recambio óseo (hipertiroidismo, inmovilización prolongada, enfermedad de Paget del hueso), falla renal, intoxicación con sustancias específicas que pueden dar como resultado hipercalcemia (por ejemplo, intoxicación con aluminio intoxicación con vitamina A) pueden beneficiarse de un tratamiento profiláctico o terapéutico de acuerdo con la invención.

En principio cualquier lípido grado alimenticio o cualquier mezcla de lípidos que comprenda ácido graso ω -3-poliinsaturado libre o un derivado de ácido graso (que incluye ti-, di-, o mono-glicéridos y fosfolípidos) puede servir como la fuente de ácido graso ω -3-poliinsaturado. Cuando se refiere aquí a ácidos grasos, esto significa que se incluyen los residuos de ácido graso correspondientes en derivados de los mismos que proporcionan el ácido graso cuando se digieren, tales como triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y fosfolípidos de estos ácidos grasos.

El ácido graso ω -3-poliinsaturado para un tratamiento de acuerdo con la invención se selecciona usualmente del grupo de ácidos grasos ω -3-poliinsaturados de cadena larga. El término “cadena larga” se utiliza aquí para ácidos grasos ω -3-poliinsaturados que tienen por lo menos 18 átomos de carbono, en particular para ácidos grasos ω -3-poliinsaturados de C18-C26.

Los ácidos grasos ω -3-poliinsaturados preferidos en particular incluyen ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosahexaonico (DHA), ácido eicosatetraenoico (ETA) y ácido docosapentanoico (DPA). De estos, en particular se han logrado buenos resultados con una mezcla que comprende EPA y DHA. Ejemplos adicionales de ácido graso ω -3-poliinsaturado, para uso de acuerdo con la invención, incluyen ácido alfa-linolenico y ácido estearidónico.

El contenido de ácido graso ω -3-poliinsaturado, en particular el ácido graso ω -3-poliinsaturado de cadena larga, en una composición de la invención es preferiblemente de por lo menos 15 g/kg, en particular por lo menos 20 g/kg, con base en el peso total de los macronutrientes de la composición. El contenido de ácido graso ω -3-poliinsaturado, en particular el ácido graso ω -3-poliinsaturado de cadena larga, es usualmente de 50 g/kg o menos, en particular de 40 g/kg o menos, con base en el peso total de los macronutrientes de la composición. Cuando se refiere en esta descripción al “peso total de los macronutrientes”, significa el contenido total de la materia proteínica, lípidos, carbohidratos más fibras dietéticas.

Una composición para uso de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente aún uno o más ácidos grasos además del ácido graso ω -3-poliinsaturado, cuyos otros ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados.

Usualmente, la composición comprende 300 g/kg o menos de ácidos grasos totales, en particular 200 g/kg o menos, más en particular 180 g/kg o menos, con base en el peso total de los macronutrientes de la composición.

El contenido de ácido graso total de una composición para uso de acuerdo con la invención en particular puede ser de por lo menos 50 g/kg, con base en el peso total de los macronutrientes de la composición, más en particular de por lo menos 100 g/kg con base en el peso total de los macronutrientes de la composición.

El contenido total de ácido graso ω -3-poliinsaturado, en particular el ácido graso ω -3-poliinsaturado de cadena larga, usualmente es por lo menos 12% de energía peso, preferiblemente por lo menos 15% de energía peso, en particular por lo menos 20% de energía peso, más en particular por lo menos 24% de energía peso, con base en los ácidos grasos totales. En la práctica, el contenido de ácido graso ω -3-poliinsaturado, en particular, el ácido graso ω -3-poliinsaturado de cadena larga, usualmente es de 75% de energía peso o menos, en particular 50% de energía peso o menos, más en particular 40% de energía peso o menos, con base en los ácidos grasos totales.

En particular, se han logrado buenos resultados con una combinación de leucina y una mezcla de PUFA, cuya mezcla comprende DHA y EPA, el DHA y EPA preferiblemente proporcionan por lo menos 5% de energía peso, en particular por lo menos 14% de energía peso de los ácidos grasos totales. La relación peso a peso de DHA a EPA, en particular puede estar en un rango de 1: 9 a 9: 1, más en particular en el rango de 2: 8 a 8: 2, o en el rango de 3:7 a 1:1.

La relación peso a peso de DPA a EPA, en particular puede estar en el rango de 1:20 a 1:4, más en particular en el rango de 1:15 a 1:8.

Como las fuentes de ácidos grasos, están comercialmente disponibles diversos aceites, por ejemplo, diversos aceites de cereales y otras plantas. El aceite marino, tal como aceite de pescado, aceite de plancton o aceite de algas en particular es adecuado como una fuente para ácidos grasos ω -3-poliinsaturados. En una realización específica, por lo menos 70% de energía peso del contenido de ácido graso ω -3-poliinsaturado se origina de aceite marino, en particular de aceite de pescado o de aceite de algas.

En términos de una dosificación diaria (para un sujeto adulto, por ejemplo, que pesa 70 kg, en particular un adulto humano), la combinación o composición se administra usualmente para proporcionar una dosificación diaria de ácido graso ω -3-poliinsaturado de cadena larga, en particular una dosificación de ácido graso ω -3-poliinsaturado de cadena larga, de por lo menos 3.5 g/día. El límite superior se puede determinar con base en una dosificación diaria máxima recomendada, de acuerdo con los principios dietéticos generales. En particular, dicha dosificación puede ser de 25 g/día o menos o 20 g/día o menos.

En particular para una combinación o composición que es para administración oral, por ejemplo, una composición nutricional líquida, tal como complementos nutricionales orales (es decir, un producto alimenticio líquido que se puede ingerir en bebidas), la dosificación diaria de ácido graso ω -3-poliinsaturado, está preferiblemente en el rango de 3.5 a 6 g/día.

En particular para una combinación o composición que es para alimentación por tubo, dicha dosificación diaria de ácido graso ω -3-poliinsaturado está preferiblemente en el rango de 10 a 20 g/día.

La leucina en general forma parte de un grupo de moléculas que se puede mencionar aquí como "materia proteínica". La materia proteínica se forma por unidades estructurales formadas de aminoácidos. El término aminoácidos como se utiliza aquí incluye residuos de aminoácidos (por ejemplo, en péptidos). En particular, el término "materia proteínica" incluye aminoácidos libres, sales de aminoácidos, ésteres de aminoácidos, los residuos de aminoácidos unidos a moléculas y péptidos de conjugación, que incluyen proteínas. De forma similar, cuando se hace referencia a un aminoácido específico, por ejemplo, leucina, esto significa que incluye el aminoácido (residuo) específico presente como una sal, en una forma unida, así como el aminoácido específico libre.

De esta manera, como se utiliza aquí, el término fuente de leucina se utiliza para cualquier compuesto que proporciona leucina cuando se administra de forma apropiada al cuerpo, en particular que proporciona leucina, luego de digestión de la fuente. La fuente de leucina en particular puede comprender por lo menos uno de los siguientes compuestos: leucina en la forma de un ácido libre (incluyendo su estado iónico bipolar); sales de leucina; péptidos que comprenden uno o más residuos de leucina; proteínas que comprenden uno o más residuos de leucina; y conjugados de leucina con un compuesto de conjugación diferente de un aminoácido, una proteína, o un péptido, cuyo conjugado es capaz de ser dividido en el aminoácido libre (o sal del mismo), preferiblemente en el intestino o estómago o después de la absorción en los enterocitos o hígado. En principio, la leucina puede estar presente como un D-isómero o un L-isómero, preferiblemente la leucina es L-leucina. Aquí adelante, a menos de que se especifique lo contrario, cuando se hace referencia a leucina, significa leucina en cualquier forma, es decir, que incluye no solo el aminoácido libre (ácido/sal) sino también leucina en cualquier forma unida.

Con un péptido significa una combinación de dos o más aminoácidos, conectados a través de uno o más enlaces peptídicos. Cuando se incorporan en un péptido, los aminoácidos se denominan residuos de aminoácidos. Los péptidos incluyen oligopéptidos y polipéptidos, que incluyen proteínas.

5 Con un polipéptido significa una cadena de péptidos que comprende 14 o más residuos de aminoácidos. Con un oligopéptido significa una cadena de péptidos que comprende de 2 a 13 residuos de aminoácidos.

Los aminoácidos quirales presentes en una combinación o composición para uso de la invención pueden estar en la forma L o forma D, usualmente en la forma L.

10 La materia proteinácea puede comprender una o más proteínas, cuyas proteínas o parte de las mismas, se pueden haber modificado, en particular por hidrólisis (parcial), usualmente al grado que hasta 20% de la proteína se hidroliza a aminoácidos libres, preferiblemente al grado que se hidroliza hasta 10% de la proteína a aminoácidos libres. Una ventaja de proteína (parcialmente) hidrolizada es un comportamiento de liberación de aminoácidos ventajoso, cuando se administra de forma entérica.

15 El contenido peptídico (oligopéptido, péptido, proteína) con base en la materia proteinácea usualmente es de por lo menos 50% de energía peso, por lo menos 60% de energía peso, o por lo menos 75. El% de energía peso del péptido, con base en la materia proteinácea, usualmente es de 99.5% de energía peso o menos, preferiblemente hasta 94% de energía peso o menos. Una ventaja de una composición en donde el contenido peptídico es alto ($\geq 50\%$ de energía peso) es que el sabor, u otra propiedad organoléptica de la composición, usualmente se aprecia mejor cuando se consume (oralmente). Adicionalmente, puede ser más gradual la absorción de aminoácidos por el cuerpo.

20 La materia proteinácea comprende preferiblemente por lo menos una proteína que tiene por lo menos 9 g de leucina por 100 g de aminoácidos. La materia proteinácea (que proporciona leucina) comprende preferiblemente por lo menos una proteína seleccionada del grupo de proteínas de suero, caseína, caseinato, proteínas de soya y proteínas de trigo, preferiblemente del grupo de proteínas de suero y caseína.

25 Con las proteínas de suero significa proteínas globulares que se pueden aislar del suero. En particular, las proteínas globulares de suero se pueden seleccionar de beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbumina y albúmina de suero, que incluyen mezclas de estas. Ejemplos de mezclas que comprenden proteínas de suero son aislados de suero y concentrados de suero.

30 En una realización, la materia proteinácea comprende proteína de suero, en particular por lo menos 10% de energía peso, con base en la materia proteinácea, preferiblemente por lo menos 15% de energía peso con base en la materia proteinácea. Usualmente, la fracción de proteína de suero es de 50% de energía peso o menos con base en la materia proteinácea, en particular 40% de energía peso o menos con base en la materia proteinácea.

En particular en el caso de una composición líquida, la concentración de proteína de suero desnaturalizada no excede preferiblemente 35% de energía peso con base en la materia proteinácea. Esto es ventajoso con respecto a evitar el riesgo de formación de gel durante el almacenamiento.

35 La presencia de una proteína de suero puede ofrecer una serie de ventajas. El suero muestra un comportamiento ventajoso de liberación tanto en términos de velocidad de liberación de los aminoácidos como de la tendencia a hacer disponibles los aminoácidos para la absorción por el cuerpo, esencialmente al mismo tiempo.

De manera ventajosa, parte de la proteína de suero se hidroliza (parcialmente), en particular hasta 50% de energía peso de la proteína de suero se puede hidrolizar (ligeramente), en particular 10-50% de energía peso.

40 Como la fuente de proteínas de suero preferiblemente se elige una fracción de suero que comprende menos de 20% de energía peso de glicomacropéptido de caseína (GMP), más preferiblemente menos de 10% de energía peso.

El contenido de beta-lactoglobulina es preferiblemente mayor de 40% de energía peso, más preferiblemente 46-80% de energía peso. Esto es ventajoso debido a que la beta-lactoglobulina tiene un contenido relativamente alto de leucina.

Cuando se utiliza como proteína intacta, la caseína comprende preferiblemente una alta concentración de beta-caseína, en particular más de 36 g/100 g de caseína, más en particular 38-70 g/100 g de caseína.

45 En una realización, toda o parte de la leucina está presente en la forma de aminoácidos libres, una sal de la misma o como un conjugado con una molécula de conjugación diferente de una proteína o péptido, cuyo conjugado es capaz de ser dividido en el aminoácido libre (o sal del mismo) y el compuesto de conjugación bajo la influencia de un constituyente biliar y/o un excremento del páncreas en el duodeno y/o el íleo. Preferiblemente, la cantidad de leucina en dicha forma, en particular en la forma de una sal o la forma libre, es por lo menos 1% de energía peso, en particular por lo menos 10% de energía peso, más en particular por lo menos 25% de energía peso, con base en la leucina total.

Preferiblemente, la cantidad de leucina en dicha forma, en particular en la forma de una sal o la forma libre es hasta 90% de energía peso, en particular hasta 75% de energía peso, más en particular hasta 60% de energía peso.

Una composición para uso de acuerdo con la invención comprende usualmente 15 g/kg de leucina o mas, preferiblemente por lo menos 25 g/kg de leucina, en particular 30 a 70 g/kg de leucina, más en particular 40 a 60 g/kg de leucina, (que incluye leucina unida) con base en el peso total de los macronutrientes de la composición.

En una realización específica, la composición comprende por lo menos 15 g/kg de leucina libre, con base en el peso total de la materia proteinácea, grasa, carbohidratos más fibras dietéticas, de la composición, en particular de 22 a 35 g/kg de leucina libre, más en particular de 30 a 35 g/kg de leucina libre.

En términos de una dosificación diaria (para un sujeto adulto, por ejemplo, que pesa 70 kg, en particular un adulto humano) usualmente se va a administrar leucina en una dosificación de por lo menos 5 g/día, preferiblemente por lo menos 7 g/día. La dosificación puede ser en particular de hasta 50 g/día, más en particular hasta 35 g/día.

Usualmente, la cantidad de leucina como un porcentaje de materia proteinácea total es por lo menos 12% de energía peso. De manera ventajosa, la cantidad de leucina como un porcentaje de materia proteinácea total es por lo menos 15% de energía peso, en particular, por lo menos 18% de energía peso, más en particular por lo menos 19% de energía peso. Dicha cantidad es usualmente de 30% de energía peso o menos, en particular de 25% de energía peso o menos.

La combinación o composición puede comprender adicionalmente uno o más ingredientes adicionales, en particular uno o más ingredientes seleccionados del grupo de carbohidratos digeribles, carbohidratos no digeribles y otras fibras dietéticas, oligoelementos, minerales, vitaminas, materia proteinácea diferente a la materia proteinácea que proporciona leucina (tal como uno o más aminoácidos libres diferentes de leucina), otros lípidos diferentes del ácido graso (poli)insaturado para el tratamiento de acuerdo con la invención, y otros aditivos típicos para composiciones nutricionales, composiciones nutraceuticas o composiciones farmacéuticas (tales como antioxidantes, saborizantes, agentes estabilizadores, o, en el caso de un producto farmacéutico: un portador farmacéuticamente aceptable). Ejemplos de ingredientes adicionales se describen, por ejemplo en los documentos WO2003/041701 (N.V. Nutricia) y WO2007/073178 (N.V. Nutricia). Ejemplos de ingredientes adicionales de los cuales uno o más pueden estar presentes en una composición para uso de acuerdo con la invención, en particular para una composición nutricional, incluyen en particular sodio, potasio, cloruro, fluoruro, yoduro, fósforo, magnesio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, ácido fólico, vitamina B12, biotina, vitamina C, ácido lipoico, zinc, hierro, cobre, manganeso, molibdeno, selenio y cromo. Dichos componentes pueden estar presentes en una concentración de hasta la dosis diaria recomendada por porción diaria.

En particular, se han logrado buenos resultados con una composición que comprende adicionalmente carbohidrato no digerible. Existen indicaciones de que la presencia de carbohidrato no digerible en combinación con el ácido graso (ω -3-poli) insaturado, en particular DHA y/o EPA, y leucina puede tener un efecto ventajoso adicional en el nivel de calcio en plasma, a través de una reducción de los niveles de citoquinas inflamatorias sistémicas. Adicionalmente, como se ilustra por los ejemplos, la presencia de carbohidrato no digerible, en particular oligosacárido no digerible puede ser beneficiosa con respecto a la función inmunitaria. En particular, pueden estar presentes uno o más oligosacáridos no digeribles, tal como uno o más oligosacáridos seleccionados del grupo de galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS). Con un oligosacárido significa una cadena que comprende de 2 a 25 residuos de sacáridos. Si está presente, el contenido de carbohidrato no digerible puede ser en particular de aproximadamente 20-70 g/kg, más en particular de 40-60 g/kg, con base en el peso de los macronutrientes. Una dosificación diaria (para un adulto, por ejemplo, de aproximadamente 70 kg) se puede seleccionar en particular en el rango de 2.5-15 g/día.

Se contempla que la intervención dietética con una dieta de bajo índice glucémico es ventajosa con respecto al tratamiento de hipercalcemia, reducción de pérdida mineral ósea o prevención de una reducción en la densidad mineral ósea en un sujeto o la regulación in vivo de la homeostasis de calcio en plasma sanguíneo. Sin estar limitado por la teoría, los inventores contemplan que una dieta de bajo índice glucémico puede afectar los niveles de calcio en suero de una manera positiva debido a que la intervención dietética con una dieta de bajo índice glucémico puede tener un efecto positivo en los niveles de calcio en suero, cuyo efecto se puede asociar a la sensibilidad potenciada a la insulina, como resultado de intervención con la dieta de bajo índice glucémico.

De acuerdo con lo anterior, en una realización específica, la composición es una composición nutricional con un bajo índice glucémico. En particular, una composición con un índice glucémico por debajo de 55, preferiblemente por debajo de 45. En la práctica, el índice glucémico siempre estará por encima de cero, y usualmente es por lo menos 1, en particular por lo menos 5. En los ejemplos adelante, se proporcionan los detalles de cómo determinar el índice glucémico de una composición.

El experto será capaz de formular una composición con un índice glucémico relativamente bajo con base en la información descrita aquí y con base en el conocimiento general común. En particular, al aumentar el porcentaje de carbohidratos que se ingiere más lentamente que la glucosa o al aumentar los carbohidratos que proporcionan menos

- unidades estructurales de glucosa por peso que la glucosa, se reduce el índice glucémico de una composición (bajo de otro forma la misma condición). Ejemplos preferidos de carbohidratos que se pueden digerir más lentamente que la glucosa es isomaltulosa, fructuosa, galactosa, lactosa, trehalosa. Junto con esa adición de grasa y fibra se puede desacelerar el vaciado gástrico. Más aún, las fibras pueden formar una barrera física en el intestino, reduciendo el índice de absorción. Los aminoácidos de la proteína pueden aumentar la liberación de insulina (especialmente leucina), y aumentar de este modo la absorción de glucosa por las células. Todos estos mecanismos pueden contribuir a una reducción en el índice glucémico.
- En una realización específica, la composición es una composición nutricional. Con una composición nutricional significa una composición que comprende componentes que son de origen natural, encontrados preferiblemente en el suministro alimenticio, que se pueden vender sin receta, como complementos, alimentos funcionales o ingredientes alimenticios funcionales, es decir, sin la prescripción de un médico o veterinario. Una composición nutricional también puede ser un alimento medicinal, propuesto para el manejo dietético de una enfermedad o afección para mamíferos bajo la supervisión de un médico o veterinario.
- Una composición nutricional para uso de acuerdo con la invención puede estar en la forma de un líquido, por ejemplo, una bebida, en la forma de un semilíquido, por ejemplo, un yogurt o una flan, en la forma de un gel, por ejemplo, una torta de gelatina o en la forma de un sólido, por ejemplo, una barra dulce o un helado.
- En una realización específica, la composición para uso de la invención es un alimento completo nutricional oral. En una realización más específica, el completo nutricional oral comprende 1.5-2.5 g/100 ml de leucina total y 0.8-2 g/100 ml de ácido graso ω -3-poliinsaturado.
- En una realización específica, la composición para uso la invención es una alimentación de tubo. En una realización más específica, la alimentación de tubo comprende 0.4-0.9 g/100 ml de leucina total y 0.4-1 g/100 ml de ácido graso ω -3-poliinsaturado.
- En una realización, se prepara una composición líquida de un concentrado, por ejemplo, de un líquido (por ejemplo, con una viscosidad de menos de aproximadamente 80 mPa. S), un semi-líquido (por ejemplo, con una viscosidad de más de aproximadamente 80 mPa.s y menos de aproximadamente 400 mPa.s), un gel o un sólido. Para dicha preparación, se puede utilizar agua para diluir el concentrado. En particular, dicha preparación ocurre justo antes de administración de la composición, por ejemplo, en una forma instantánea.
- En una realización específica la composición nutricional para uso de acuerdo con la invención comprende materia proteinácea, un lípido, y un carbohidrato digerible, en donde
- a) el contenido de materia proteinácea proporciona de 18 a 50% de energía, preferiblemente de 20 a 40% de energía, más preferiblemente de 22 a 32% de energía de la composición total;
- b) el contenido de lípido proporciona de 10 a 50% de energía, preferiblemente de 20 a 40% de energía, más preferiblemente de 25 a 35% de energía de la composición total;
- c) el contenido de carbohidrato digerible proporciona de 20 a 70% de energía, preferiblemente de 30 a 60% de energía, más preferiblemente de 38 a 48% de energía de la composición total.
- El valor energético de un compuesto (% de energía) se basa en la energía proporcionada por la parte digerible (en particular en un humano) del compuesto. En particular, el valor energético se basa en la contribución de la materia proteinácea, lípidos y carbohidratos digeribles, utilizando los siguientes factores de cálculo: 4 kcal/g para carbohidratos digeribles y materia proteinácea y 9 kcal/g para lípidos.
- El valor energético total de una composición líquida para uso de acuerdo con la invención se puede elegir dentro de límites amplios, por ejemplo, de 0.2 a 4 kcal/ml. Usualmente, el valor energético total es por lo menos 0.3 kcal/ml, en particular por lo menos 0.8 kcal/ml, más en particular por lo menos 1.2 kcal/ml. Usualmente, el valor energético total es de 3.0 kcal/ml o menos, en particular 2.6 kcal/ml o menos, más en particular 2.4 kcal/ml o menos.
- En una realización específica, una composición líquida para uso de acuerdo con la invención tiene un valor energético en el rango de 0.3 a 3.0 kcal/ml, preferiblemente de 0.8 a 2.6 kcal/ml, más preferiblemente de 1.2 a 2.4 kcal/ml.
- En una realización específica adicional, la composición líquida para uso de acuerdo con la invención tiene un valor energético en el rango de 0.2 a 1.0 kcal/ml, preferiblemente de 0.4 a 0.9 kcal/ml. Dicha composición puede en particular ser para el uso por personas de edad avanzada.

Los factores que cumplen una función en la determinación de un valor energético deseable incluyen por una parte la facilidad para lograr un mayor % de energía de materia proteínica, y por otra parte un rápido vaciado del estómago (incrementar la respuesta anabólica).

5 La combinación o composición de la invención se puede administrar bajo la supervisión de un especialista médico, o se puede auto-administrar.

La composición o combinación se puede administrar de forma entérica (por alimentación con tubo) o de forma oral.

La invención ahora se describirá con base en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ejemplo de Formulación de Complemento nutricional oral

10 Tabla 1: Composición nutricional del complemento nutricional oral

	rango preferido (g/100 ml)	formulación específica (g/100 ml)
materia proteínica	9-12	10.1
- que contiene leucina total	1.5-2.5	1.95
- de la cual es leucina libre	0.9-1.5	1.1
carbohidratos (digeribles)	10-25	5.3
Grasa	2-6	5.3
- de la cual es insaturada	2-6	5.3
- de la cual es ω 3-PUFA	0.8-2	1.1
fibra dietética (soluble)	1-4	2

Ejemplo 2: Ejemplo de Formulación de alimentación por tubo

Tabla 2: composición nutricional de alimentación por tubo

	rango preferido (g/100 ml)	formulación específica (g/100 ml)
materia proteínica	6-10	7.8
- que contiene leucina total	1.0-2.0	1.5
- de la cual es leucina libre	0.4-0.9	0.8
carbohidratos (digeribles)	10-25	17
Grasa	2-6	5.4
- de la cual es insaturada	2-6	4.5
- de la cual es ω 3-PUFA	0.4-1	0.8
fibra dietética (soluble)	1-4	1.5

Ejemplo 3, Resultados de prueba

Materiales y Métodos

Ratones CD2F1 machos de 6-7 semanas de edad (BALB/c x DBA/2, Harlan/Charles River Países Bajos) se alojan individualmente en un cuarto con clima controlado (ciclo de oscuridad-luz 12:12 con una temperatura ambiente constante de $21 \pm 1^\circ \text{C}$). Después de aclimatación durante una semana, los ratones se dividen en grupos emparejados en peso: (1) control que recibe comida de control, (2) que tienen tumor que reciben comida de control, y (3) que tiene tumor que reciben dietas experimentales. Los datos mostrados se derivan de la combinación de varias series experimentales con características animales idénticas y procedimientos experimentales idénticos (a menos que se indique lo contrario) y difieren solo en las dietas experimentales utilizadas. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Animal Ethical Committee (DEC consult, Bilthoven, Países Bajos) y cumplieron con los principios del buen cuidado de animales de laboratorio.

Dietas Experimentales (Experimentos de Categorías A y B)

Los experimentos se dividen en: (A) experimentos diseñados para probar el efecto de componentes nutricionales únicos o combinaciones de componentes nutricionales (adición de leucina (leu) libre, ácido graso ω -3-poliinsaturado (de aceite de pescado) (fo)), o la combinación de los mismos agregada a la dieta de base (AIN93-M con alta proteína (151 g de caseína/kg)) y suministrada como píldoras; (B) experimentos diseñados para probar el efecto de una combinación nutricional compleja que asemeja la composición de una actualización de FortiCare (Nutricia Advanced Medical Nutrition, NL) y comprende todos los componentes individuales probados en (A), y que difiere en la composición de macronutrientes de AIN-93 para lograr una dieta tipo occidental más humanizada, suministrada como una pasta por razones técnicas del producto.

La dieta de control con alto contenido de proteína AIN93-M en los experimentos en los cuales se prueba el efecto de los ingredientes individuales, contiene por kg de alimento: 151 g de proteína (100% de caseína), 702 g de carbohidratos y 40 g de grasa (100% de aceite de soya) (Research Diet Services, Wijk bij Duurstede, Países Bajos). Las dietas experimentales en esta categoría se ajustan a las dietas de control al reemplazar parcialmente los carbohidratos y/o el aceite de soya por leucina (150 g de caseína/kg y 16 g de leucina/kg de alimento; leu), aceite de pescado (150 g de caseína/kg y 22 g de aceite de pescado/kg de alimento; fo), o leucina y aceite de pescado (151 g de caseína/kg, 16 g de leucina/kg y 22 g de aceite de pescado/kg de alimento; leu+fo). Los 22 g de aceite de pescado contienen 6.9 g de EPA y 3.1 g de DHA que da como resultado una relación de EPA:DHA de 2.2:1.

En el experimento en el cual se prueba la combinación total de alta proteína, leucina, ácido graso ω -3-poliinsaturado (de aceite de pescado) y oligosacáridos, la dieta de control contiene por kg de alimento, 126 g de proteína (caseína), 53 g de grasa (aceite de maíz), y 699 g de carbohidratos. La dieta experimental isocalórica (referida adicionalmente como Composición Nutricional Específica; SNC) contiene por kg de alimento: 210 g de proteína (189 g de proteína intacta de la cual es 68 % de caseína y 32 % de suero y 21 g de leucina libre) 53 g de grasa (20.1 g de aceite de maíz, 10.2 g de aceite de canola, y 22.2 g de aceite de pescado), 561 g de carbohidratos, 18 g de galactooligosacáridos y 2 g de fructo-oligosacáridos.

Modelo de Tumor

Se cultivan células de adenocarcinoma C-26 de murino in vitro con RMPI 1640 complementado con 5% de suero de becerro fetal y 1 % de penicilina-estreptomicina (31). Las células tumorales se tratan con tripsina en un estado subconfluyente y después del lavado, se suspenden en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) a una concentración de 2.5×10^6 células mL^{-1} . Bajo anestesia general (isoflurano/ $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$), las células tumorales (5×10^5 células en 0.2 mL) se inoculan de manera subcutánea en el flanco inguinal derecho de los ratones. Los animales de control (C) reciben una inyección falsa con 0.2 mL de HBSS.

Protocolo Experimental

Después de inoculación de las células tumorales o HBSS, se miden la masa corporal, ingestión de alimento y el tamaño del tumor (longitud y ancho) tres veces por semana. Solo en el experimento de la categoría B, se monitoriza la actividad diaria en la jaula. En todos los experimentos, los animales se anestesian y se pesan en el día 20 después de inoculación del tumor. Se diseccionan y pesan los músculos esqueléticos (por ejemplo, m. Tibialis Anterior (mTA), m. Gastrocnemius (mG), m. Extensor Digitorum Longus (mEDL) y M. Soleus (mS)), el tumor, bazo, riñones, hígado, grasa epitidial, timo, pulmones y corazón. Se calcula la masa corporal del cuerpo al sustraer la masa tumoral de la masa corporal. Adicionalmente, se prueba la función muscular ex vivo en el experimento de la categoría B.

Evaluación de Actividad diaria

La actividad física se monitoriza continuamente (24h) durante el periodo de estudio de 20 días que inicia en el día 2, utilizando sensores de actividad (detector de tecnología dual DUO 240, Visonic; adaptado por R. Visser, NIN, Amsterdam, Países Bajos) que traducen cambios individuales en el espectro infrarrojo provocado por los movimientos de los animales en conteos de actividades arbitrarias. Los sensores se montan por encima de las jaulas y se conectan a través de puertos de entrada y se interconectan a un ordenador con el software MED-PC IV para la recolección de datos (MED associates, Sto Albans, VT). La actividad se expresa en conteos por hora (para el periodo total de 24 horas, el periodo de oscuridad (periodo activo, los ratones son animales nocturnos) y el periodo de luz (periodo inactivo)). La actividad se calcula para cada ratón de forma separada y se expresa con relación a su propia actividad total en el día 2, para corregir las diferencias en la sensibilidad individual de los sensores. Se promedian las actividades de dos días posteriores, para moderar la variabilidad día a día. Con el fin de determinar los cambios en el patrón de actividad a lo largo del experimento, la actividad cada hora y en la oscuridad-luz se expresan como porcentaje de la actividad diaria total y se traducen en un actograma.

Evaluación de la funcionalidad muscular

Se evalúan las características contráctiles del músculo EDL derecho ex vivo, como se describió anteriormente (van Norren, K., Kegler, D., Argiles, J.M., Luiking, Y., Gorselink, M., Laviano, A., Arts, K., Faber, J., Jansen, H., van der Beek, E.M. & van Helvoort, A. (2009): Dietary supplementation with a specific combination of high protein, leucine, and fish oil improves muscle function and daily activity in tumour-bearing cachectic mice. *Br J Cáncer.*, 100, 713-22.).

De forma breve, se permite que los músculos se estabilicen en el baño de órgano durante 30 minutos, después de lo cual se determinan la resistencia y corriente de estimulación óptima. Luego, se determinan las características de fuerza-frecuencia (10 a 167 Hz, 250 ms) y después de re-abastecer el regulador de órgano y de un periodo de descanso de 5 minutos, los músculos se someten a un protocolo de ejercicio (83 Hz, 250 ms cada 1000 ms). Este protocolo representa una carga moderada, comparable con la actividad diaria normal. A la frecuencia utilizada, se alcanza el tétanos completo del músculo. Se analizan las señales de fuerza isométrica de la curva de fuerza-frecuencia para fuerza máxima y total y para contracción máxima y la velocidad de relajación.

Estadísticas

Todos los datos se expresan como la media $\pm$ EEM. Se realizan análisis estadísticos utilizando SPSS 15.0 (SPSS Benelux, Gorinchem, Países Bajos). En el experimento A, se utilizan diferentes tandas de animales, por lo tanto, para todos los parámetros se define que la combinación de datos se permite si no se presenta interacción entre los grupos y los experimentos. Los datos de la composición corporal, del tumor y de las masas de órganos en el día 20 se comparan entre grupos con análisis de varianza (ANOVA) y LSD post-hoc. Las diferencias se consideran significativas a un valor p por, debajo de α/k ; en los cuales $\alpha=10\%$ y k =cantidad de comparaciones. Para el experimento A, el valor p tiene que estar por debajo de 0.02; para el experimento B, el valor p tiene que estar por debajo de 0.05. Los datos de la ingestión de alimento, peso corporal, actividad diaria, y función muscular que se monitorizan durante los 20 días después de inoculación, se analizan mediante mediciones repetidas ANOVA. Para discriminar adicionalmente las diferencias entre grupos, se calculan las diferencias o deltas de la primera medición en el rango. Estos deltas se comparan entre los grupos utilizando ANOVA, con LSD post-hoc para comparación entre pares entre grupos. Para la función músculo esquelético, los datos de la primera medición en el día 20 no son similares entre los grupos, por lo tanto se realiza discriminación adicional en un análisis por punto ANOVA. Las diferencias se consideran significativas a una p de dos colas < 0.05 .

Resultados

La densidad mineral ósea se reduce en ratones que tienen tumor (TB) en comparación con los ratones de control (C) (Figura 1A). La adición de ya sea leucina o ácido graso ω -3-poliinsaturado (de aceite de pescado) no da por resultado cambios significativos en comparación con TB. Sin embargo, la combinación de ácido graso ω -3-poliinsaturado y leucina, da por resultado un aumento significativo de la densidad mineral ósea en comparación a TB. La presencia de un tumor induce un aumento en los niveles de calcio en plasma de aproximadamente 75% (Figura 1B). La complementación con ingredientes únicos (TB-leu o TB-fo) no tiene efecto en los niveles de calcio de los animales que tienen tumor. La combinación de leucina y ácido graso ω -3-poliinsaturado, sin embargo da como resultado una reducción significativa de los niveles de calcio en plasma. Las reducciones similares en los niveles en plasma se encuentran en animales complementados con una combinación nutricional completa de aceite de pescado, leucina y oligosacáridos (experimento B) (Figura 2).

Los músculos de los animales de control muestran una mayor fuerza máxima, velocidad máxima de contracción y velocidad máxima de relajación en comparación con los ratones de control de TB. La combinación nutricional específica de ácido graso ω -3-poliinsaturado, leucina (parte leucina libre, parte unida en proteína) y oligosacáridos corrige esto en parte para las diferencias dependientes de la masa muscular como para las diferencias independientes de la masa muscular. Se utiliza el mismo experimento para estudiar en más detalle la correlación de los niveles en calcio con los parámetros de desempeño muscular. Para todas las frecuencias a las cuales se puede obtener el tétanos (>83 Hz), los parámetros de la función muscular (fuerza máxima, velocidad máxima de contracción y velocidad máxima de relajación)

se correlacionan negativamente con los niveles de calcio (R por abajo -0.7 y $p < 0.05$) (Figura 3). Cuando se corrigen los parámetros de función muscular, fuerza máxima, velocidad máxima de contracción y velocidad máxima de relajación, para la masa muscular permanecieron correlaciones negativas (R entre -0.4 y -0.7) (Figura 3).

5 Las estimulaciones repetitivas a 83 Hz, que imitan un ejercicio moderado, inducen pérdida de fuerza máxima en los tres grupos. La pérdida en la fuerza es más severa en el grupo de TB-CON en comparación con el grupo de CON. La combinación nutricional especializada normaliza parcialmente esto. En la Figura 4, se muestran ejemplos representativos (la curva más cercana a la curva media) de las curvas de fuerza completa obtenidas durante el ejercicio. Para todas las curvas, el patrón de los picos cambia en las primeras 5 repeticiones. El punto de tiempo en el cual se obtiene la fuerza máxima cambia al final del impulso en comparación con la primera repetición.

10 Para obtener un mejor entendimiento de la resistencia del músculo a la fatiga, se calculan cambios relativos en la fuerza máxima. Si los datos se presentan con relación a la fuerza máxima al inicio del ejercicio (corregidos para la masa muscular), las primeras 20 repeticiones dan como resultado pérdida acumulada similar de la fuerza máxima y también a las 80 repeticiones, es la misma (Figura 5). Sin embargo, los ratones de control muestran menos pérdida acumulada de la fuerza máxima entre las 20 y 50 repeticiones que los ratones que tienen tumor. Los ratones de TB-SNC muestran una
15 tendencia a una pérdida intermedia de la fuerza máxima relativa. Esta diferencia en el patrón de distribución de las fuerzas máximas relativas llega a ser más prominente cuando se expresa como pérdida relativa por 10 repeticiones (Figura 6). Tanto las curvas de CON y TB-SNC son significativamente diferentes de TB-CON a partir de las repeticiones 30-70. Los datos también muestran menos pérdida relativa de fuerza máxima en las primeras 40 repeticiones.

20 Para aclarar adicionalmente la relación entre la función muscular durante la estimulación repetitiva y el calcio, se determina que el parámetro de función muscular se correlaciona mejor con los niveles de calcio a todo lo largo de la estimulación repetitiva completa. En la Figura 7, se muestran los parámetros de la función muscular que muestran un factor de correlación de menos de -0.35 y < 0.05 durante por lo menos 50 repeticiones. Para las primeras 40 repeticiones, la velocidad de relajación corregida para la masa muscular muestra la correlación negativa más severa con los niveles de calcio. Desde 40 a 80 repeticiones, la fuerza máxima corregida para la masa muscular se correlaciona
25 mejor de forma negativa con los niveles de calcio. Cuando se utiliza un conjunto cuadrático de datos de calcio, son similares los factores de correlación de masa muscular.

La actividad diaria declina en el grupo de TB-CON, que se normaliza parcialmente en el grupo de TB-SNC en comparación a CON (Figura 8). CON y TB-SNC son significativamente diferentes de TB-CON. La actividad diaria total se correlaciona negativamente con los niveles de calcio (Tabla 3B). La actividad en el periodo de oscuridad (activo) se
30 correlaciona aún mejor con las concentraciones de calcio. No existe correlación entre los niveles de calcio y la actividad en el periodo de luz (inactivo). Los niveles cuadráticos de calcio se correlacionan ligeramente menos con los parámetros de la actividad.

Discusión

35 Los resultados indican que una normalización parcial de los niveles de calcio, solo se alcanza cuando se combinan leucina y ácido graso α -3-poliinsaturado (de aceite de pescado).

Adicionalmente, esta combinación es adecuada para normalizar parcialmente la distribución de la pérdida en la fuerza máxima relativa.

40 En particular, se observa una mejora en la actividad diaria (nocturna en los animales de prueba) en comparación con un grupo de control. Más aún, las concentraciones de calcio se correlacionan con la actividad diaria, y especialmente con la actividad en el periodo de oscuridad (activo), nuevamente, sugiriendo que la incidencia de la fatiga se puede reducir de acuerdo con la invención.

45 Los datos de la estimulación repetitiva, que imitan un ejercicio, como los datos desde las estimulaciones individuales en diferentes frecuencias sugieren que los niveles de calcio se correlacionan de una manera casi lineal con el desempeño muscular. Por lo tanto, la prevención o tratamiento de elevación de los niveles de calcio con intervenciones nutricionales puede ser una opción para pacientes con o en riesgo de hipercalcemia para contribuir al mantenimiento de la calidad de vida del paciente.

Ejemplo 4: Determinación de índice Glucémico

Definición

50 El índice glucémico (GI, por sus siglas en ingles) de un carbohidrato proporciona una medida de su capacidad para aumentar las concentraciones post-pandriales de glucosa. Los alimentos con alto GI dan mayores niveles post-pandriales de glucosa en sangre que aquellos con un bajo GI. El GI de un carbohidrato también predice la respuesta a insulina a ese alimento.

El GI de un carbohidrato se calcula al valorar una respuesta glucémica de dos horas de 25 g con aquella de la glucosa normal de 25 g de carbohidrato posterior:

GI es igual "Al área creciente bajo la curva de respuesta de glucosa en sangre para un alimento de prueba que contiene 25 g de carbohidrato" dividido por el "Área correspondiente después de porción equivalente de carbohidrato de glucosa".

5 Metodología del índice Glucémico

El carbohidrato disponible se define para los propósitos de prueba de GI como: carbohidrato total menos los carbohidratos no digeribles (solubles e insolubles) que son desde un punto fisiológico, fibras dietéticas (por ejemplo, insulina, FOS, almidón resistente tipo 3).

Las muestras proporcionadas deben ser representativas del producto que está disponible al consumidor en el mercado.

- 10 Todos los alimentos presentados para prueba se prueban in vivo, es decir, en 10 sujetos humanos que consumen cantidades que contienen el equivalente de 25 g de carbohidrato disponible. Son sujetos saludables sin enfermedades crónicas, sin diabetes ni deterioro de glucosa. Los sujetos tienen un BMI entre 18.5-27 kg/m².

Alimento de referencia: El alimento de referencia es 25 g de polvo de glucosa disuelto en 250 ml de agua. Cada persona prueba el alimento de referencia por lo menos dos veces.

- 15 Alimentos de prueba: Los alimentos de prueba se preparan de acuerdo con las instrucciones del fabricante, que representa el alimento como se consume normalmente. Los alimentos de prueba se consumen solo una vez en ocasiones separadas como una porción que proporciona 25 g de carbohidrato disponible, definido como anteriormente.

- 20 Sujetos de Protocolo: Los sujetos se prueban en la mañana después de un ayuno durante la noche de 10-12 horas. Se toman dos muestras de sangre en ayunas (-5 y 0) con 5 minutos de separación después de lo cual los sujetos consumen la comida de prueba o el alimento de referencia a una velocidad uniforme durante 15 minutos. Se toman muestras adicionales de sangre a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos después de empezar el alimento. La comida de prueba y el alimento de referencia se deben consumir con una bebida de agua de 250 ml. Esto permanece constante para cada una de las pruebas en la serie.

- 25 24 horas antes de la prueba de GI: El día antes de cada sesión, los sujetos se abstienen de beber alcohol y evitan niveles inusuales de ejercicio y de ingestión de alimento. Los sujetos deben tener una comida en la tarde con base en el alimento rico en carbohidratos, tal como arroz, pasta, pan, patatas y sin demasiada grasa. Esta comida no debe incluir frijoles, legumbres o leguminosas (para evitar un segundo efecto de comida a la siguiente mañana). Es importante que coman la cena y no ayunen durante más de 18 horas. Se les pide a los sujetos estar en un estado similar cada vez que viene a una sesión. Después de que han comido su cena, los sujetos ayunan durante por lo menos 10 horas durante la noche antes del inicio de su sesión de prueba la siguiente mañana. Pueden beber solo agua durante el periodo de ayuno.

Muestreo de sangre: Se obtendrá sangre por pinchazo de dedo.

Se recolecta la sangre sin inhibidores de coagulación (heparina, EDTA).

- 35 Ensayo de glucosa: La sangre entera del capilar se mide por un analizador automático de glucosa. En este caso, se utilizan analizadores de glucosa Hemocue.

Análisis de datos: El área creciente bajo la curva de respuesta a glucosa sanguínea (iAUC), ignorando el área bajo el valor de referencia, se calcula geométricamente como sigue:

Para los tiempos t₀, t₁,... t_n, las concentraciones de glucosa en sangre son G₀, G₁,... G_n, respectivamente:

$$iAUC = \sum_{n=1}^{x=1} A_x$$

- 40 en donde A_x = la AUC para el x-ésimo intervalo de tiempo (es decir, entre t_{x-1} y t_x).

Para el primer intervalo de tiempo (es decir, x=1):

si G₁>G₀, A₁ = (G₁-G₀) x (t₁-t₀)/2 o de otra forma, A₁=0

Para los otros intervalos de tiempo (es decir, $x \neq 1$)

si $G_1 \geq G_0$ y $G_{x-1} \geq G_0$, $A_x = \{[(G_x - G_0)/2] + (G_{x-1} - G_0)/2\} \times (t_x - t_{x-1})$

si $G_1 > G_0$ y $G_{x-1} < G_0$, $A_x = [(G_x - G_0)^2 / (G_x - G_{x-1})] \times (t_x - t_{x-1})/2$

si $G_1 < G_0$ y $G_{x-1} > G_0$, $A_x = [(G_{x-1} - G_0)^2 / (G_{x-1} - G_x)] \times (t_x - t_{x-1})/2$

5 si $G_1 \leq G_0$ y $G_{x-1} \leq G_0$, $A_x = 0$

Cálculo de GI: En sujetos individuales, el valor de GI es la iAUC para cada alimento expresado como un porcentaje de la iAUC media de los dos alimentos de referencia (glucosa). El GI del alimento de prueba es la media $GI \pm EEM$ de los 10 sujetos.

10 Se pueden excluir hasta dos valores atípicos (un valor atípico es un individuo cuyo GI difiere de la media por más de dos SD) del conjunto de prueba. La SEM debe estar dentro de 20% de la media.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de una fuente de leucina y una fuente de ácido graso ω -3 insaturado para uso en un tratamiento profiláctico o terapéutico de hipercalcemia, en donde la combinación es para uso en el tratamiento de un sujeto que sufre de un cáncer.
- 5 2. Una combinación de una fuente de leucina y una fuente de ácido graso ω -3 insaturado para uso en la reducción de pérdida mineral ósea o para uso en la prevención de una reducción en la densidad mineral ósea en un sujeto o para uso en la regulación in vivo de la homeostasis de calcio en el plasma sanguíneo en un sujeto, en donde dicho sujeto es un sujeto que sufre de un cáncer.
- 10 3. Una combinación para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el tratamiento es para uso en la reducción de fatiga.
4. Una combinación para un uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende por lo menos una fuente de ácido graso ω -3 poliinsaturado que proporciona un ácido graso ω -3 poliinsaturado seleccionado del grupo de ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosatetraenoico y ácido docosapentaenoico.
- 15 5. Una combinación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sujeto sufre de un cáncer seleccionado del grupo de cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de mieloma múltiple, y cáncer de cabeza y cuello.
- 20 6. Una combinación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso en el tratamiento de liberación excesiva de calcio desde el hueso y/o músculo esquelético; y/o para uso en el tratamiento de acumulación excesiva de calcio debido a falla renal o hiperparatiroidismo.
7. Una combinación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la combinación es para uso en el tratamiento de un paciente sometido a radioterapia o quimioterapia.
- 25 8. Una combinación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la fuente de leucina comprende por lo menos un compuesto seleccionado del grupo de leucina en la forma de un ácido libre (que incluye su estado iónico bipolar); sales de leucina; péptidos que comprenden una o más unidades de leucina; proteínas que comprenden una o más unidades de leucina; y conjugados de leucina con un compuesto de conjugación diferente de un aminoácido, una proteína, o un péptido, cuyo conjugado es capaz de ser dividido en el aminoácido libre (o sal del mismo), preferiblemente en el intestino o estómago o después de absorción en los enterocitos o hígado.
- 30 9. Una combinación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la fuente de leucina comprende por lo menos 12% en peso, más preferiblemente 15% en peso de leucina aún más preferiblemente más 18% en peso de leucina con base en la materia proteínica total.
10. Una composición nutricional, una composición farmacéutica o una composición nutracéutica que comprende una combinación de una fuente de leucina y una fuente de ácido graso ω -3 poliinsaturado para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 35 11. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende por lo menos un carbohidrato.
12. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde por lo menos un carbohidrato es por lo menos un oligosacárido.
13. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la composición comprende por lo menos un oligosacárido seleccionado del grupo de galactooligosacáridos y fructooligosacáridos.
- 40 14. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, 11, 12 o 13, que comprende por lo menos 15 g/kg de leucina total, con base en el peso total de la materia proteínica, grasa, carbohidratos más fibras dietéticas, de la composición, en particular 30 a 70 g/kg leucina, más en particular 40 a 60 g/kg leucina.
- 45 15. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, que comprende por lo menos 15 g/kg leucina libre, con base en el peso total de materia proteínica, grasa, carbohidratos más fibras dietéticas, de la composición, en particular 22 a 35 g/kg leucina libre, más en particular 30 a 35 g/kg leucina libre.

16. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, que tiene un contenido de ácidos grasos ω -3 poliinsaturados, con base en los lípidos totales, de por lo menos 12% en peso, preferiblemente de 18% en peso o más.
- 5 17. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, en donde la composición comprende un aceite marino o una fracción del mismo, cuyo aceite marino o fracción del mismo proporciona por lo menos 70% en peso del total de ácidos grasos ω -3 poliinsaturados en la composición.
18. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en donde la composición es una composición nutricional que tiene un índice glucémico de menos de 55, en particular de menos de 45.
- 10 19. Una combinación para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o una composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, para uso en el tratamiento de un humano.

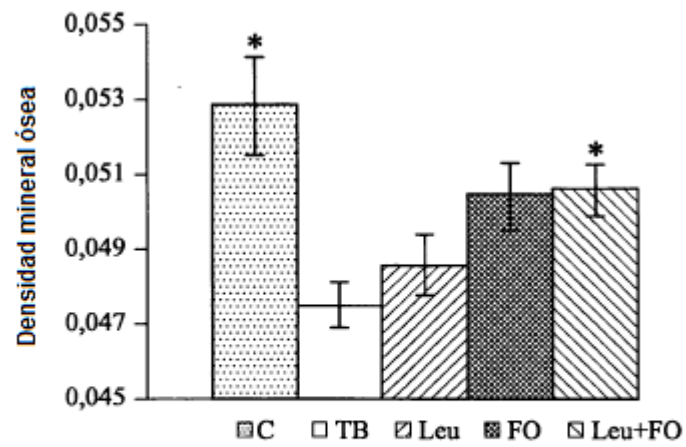


Fig. 1A

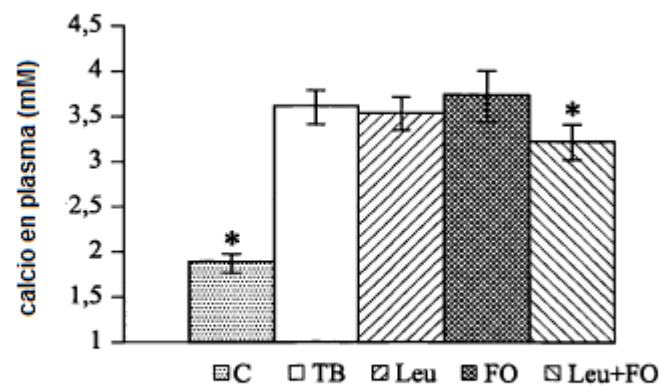


Fig. 1B

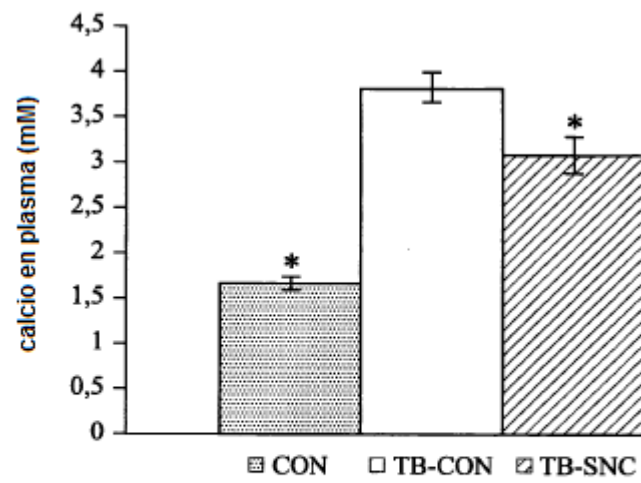


Fig. 2

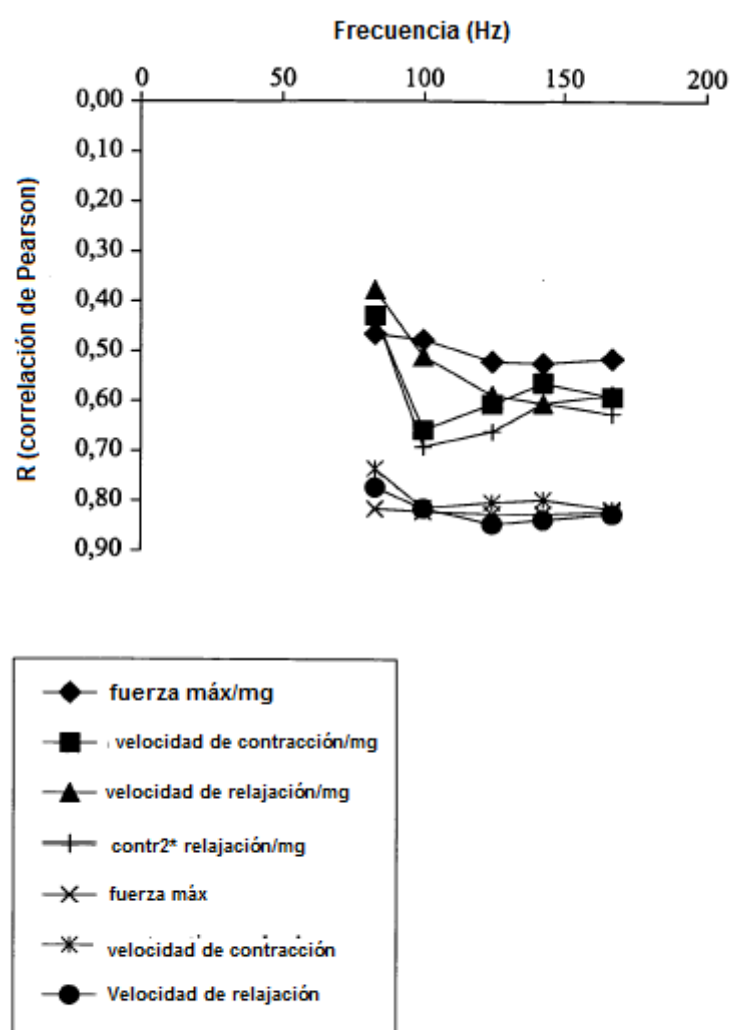


Fig. 3

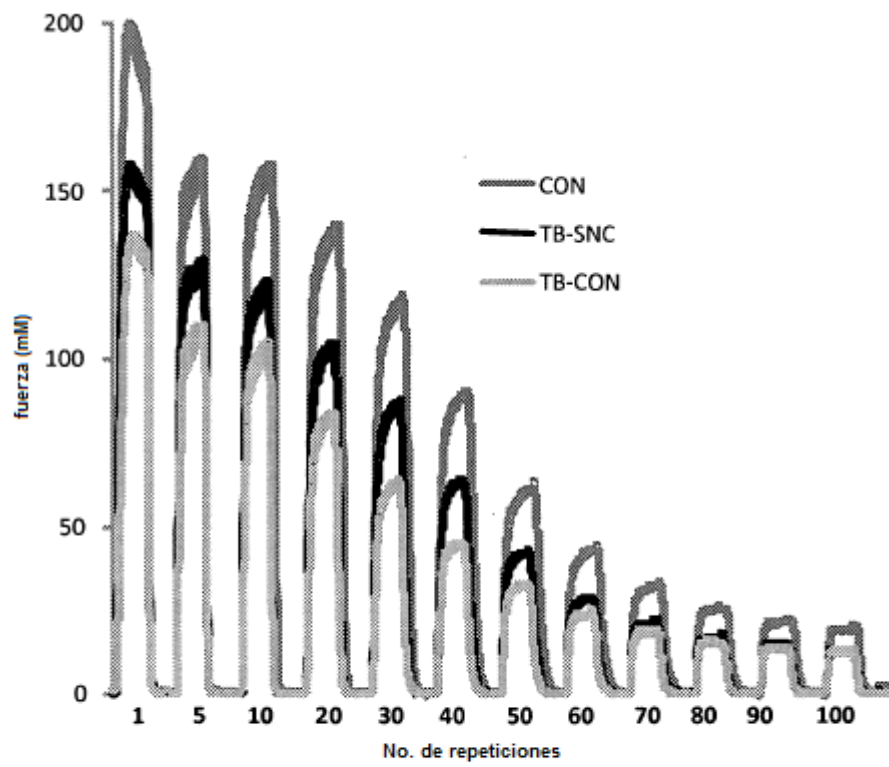


Fig. 4

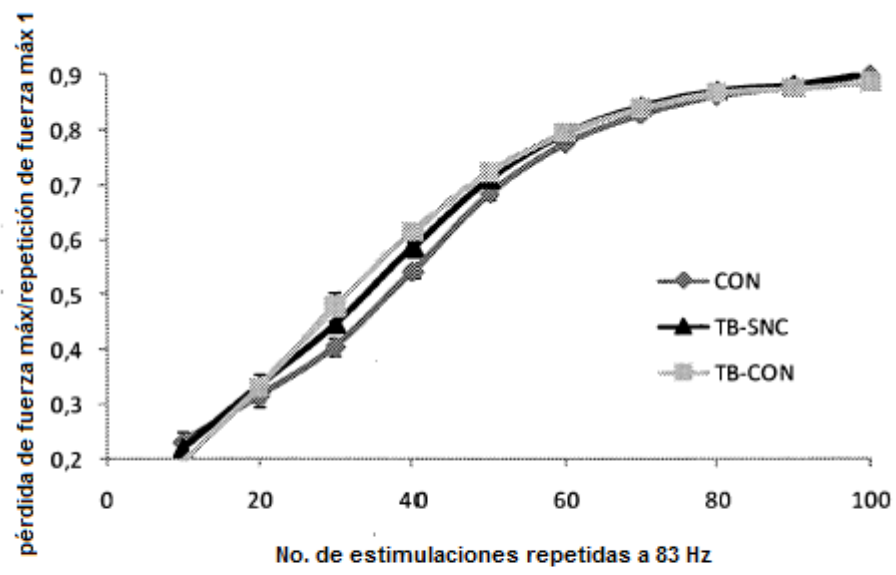


Fig. 5

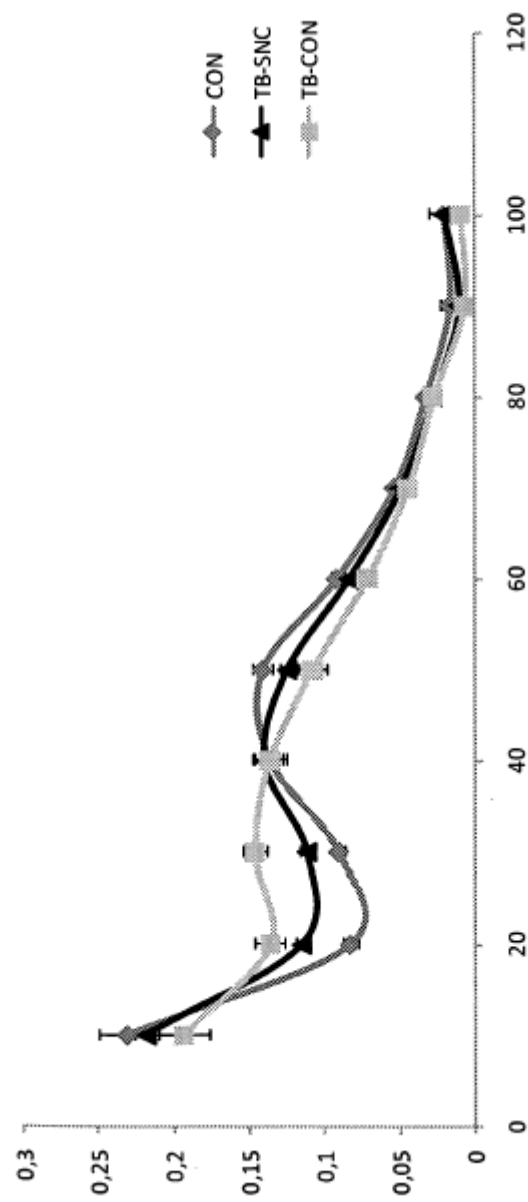


Fig. 6

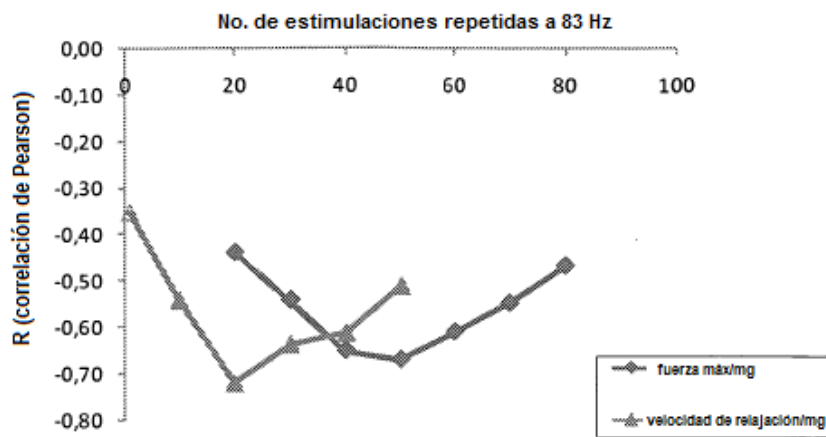


Fig. 7

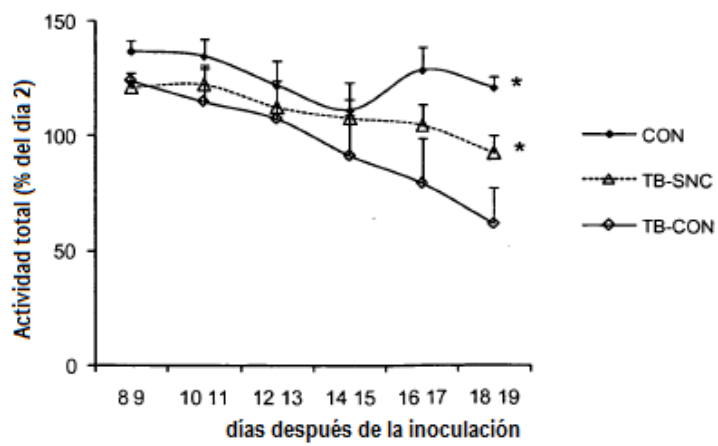


Fig. 8