

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 669 094**

(51) Int. Cl.:

**A23L 33/00** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61P 3/02** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2010 PCT/US2010/038340**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2010 WO10144821**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2010 E 10724977 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2440232**

---

(54) Título: **Alimentos medicinales de glicomacropéptidos para el tratamiento nutricional de la fenilcetonuria y otros trastornos metabólicos**

(30) Prioridad:

**12.06.2009 US 186690 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.05.2018**

(73) Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION (100.0%)  
614 Walnut Street Madison, WI 53705 , US**

(72) Inventor/es:

**NEY, DENISE, M. y ETZEL, MARK, R.**

(74) Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 669 094 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**

## Alimentos medicinales de glicomacropéptidos para el tratamiento nutricional de la fenilcetonuria y otros trastornos metabólicos

5

## Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a alimentos medicinales usados para el tratamiento nutricional de trastornos metabólicos tales como la fenilcetonuria. En particular, la presente invención se dirige a alimentos medicinales que contienen glicomacropéptidos como una fuente primaria de proteínas complementada con cantidades adicionales de los aminoácidos arginina, leucina y tirosina.

## **Antecedentes de la invención**

15 La fenilalanina (Phe) es un aminoácido indispensable que es convertido en tirosina por la enzima fenilalanina hidroxilasa (PAH; EC 1.14.16.1) en un individuo con metabolismo normal. Aproximadamente 1 de cada 15.000 bebés que nacen al año tienen una función ausente o alterada de esta enzima, y son diagnosticados con el trastorno metabólico fenilcetonuria (PKU) (Scriver C. R. 2001, "The Metabolic & Molecular Bases of Inherited disease", 8<sup>a</sup> ed. Nueva York: McGraw-Hill). Si la dieta de un individuo con PKU no se modifica en el transcurso de los primeros 20 días de vida, la Phe y sus productos de degradación se acumulan en la sangre y en el cerebro, causando daño neurológico y discapacidad cognitiva.

El tratamiento dietético de la PKU requiere una dieta baja en Phe, sugerida de por vida. Las personas con PKU deben evitar los alimentos tales como la carne, los productos lácteos, las legumbres y el pan, debido al alto contenido de Phe. Aunque se permiten algunos alimentos naturales bajos en proteínas en la dieta baja en Phe (principalmente ciertas frutas y verduras), la mayoría de las proteínas de las dietas de la dieta convencional para la PKU normalmente son suministradas por una fórmula de aminoácidos sin Phe. Un recuento diario del consumo total de Phe para adultos mayores de 19 años no debe superar un valor diana de 220 a 770 mg/día para mujeres o de 290 a 1.200 mg/día para varones (Acosta P y Yanicelli S. 2001, "Protocol 1-Phenylketonuria (PKU)", in Division, R. P., (editor), The Ross Metabolic Formula System Nutrition Support Protocols. 4<sup>a</sup> ed: Ross Product Division).

La dieta basada en la fórmula convencional de aminoácidos para la PKU es difícil de seguir, restrictiva y desagradable. El incumplimiento, un problema común con la dieta convencional para la PKU, puede causar un deterioro neuropsicológico grave. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de alimentos medicinales que sean más apetecibles que las fórmulas convencionales a base de aminoácidos y que proporcionen a los pacientes con PKU la proteína necesaria, incluyendo los aminoácidos esenciales, a la vez que mantengan eficazmente bajos niveles de Phe en la sangre y el cerebro.

40 Lim *et al.*, "Molecular Genetics and Metabolism", 2007, 92, pág. 176-178 desvela que se pueden fabricar alimentos y bebidas bajos en fenilalanina aceptables con glicomacropéptidos del suero del queso para individuos con PKU. Van Calcar *et al.*, *Am J. Clinical Nutrition*, 2009, 89, pág. 1068-77 desvela un mejor tratamiento nutricional de la fenilcetonuria mediante el uso de una dieta que contenga glicomacropéptidos en comparación con los aminoácidos.

## **Sumario de la invención**

45 La presente invención proporciona alimentos medicinales diseñados para aumentar el cumplimiento de la dieta y la calidad de vida para individuos con trastornos metabólicos tales como la PKU. En un aspecto, la invención engloba un alimento medicinal para su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico que es un trastorno metabólico de la fenilalanina, un trastorno metabólico de la tirosina, un trastorno del triptófano o un trastorno metabólico de la histidina, comprendiendo el alimento medicinal glicomacropéptidos (GMP) y cantidades complementadas de dos o más aminoácidos, en el que uno de los aminoácidos complementados es arginina y la proporción en peso en los alimentos medicinales del aminoácido arginina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 60 a 90 miligramos de arginina/gramo de proteína total (más preferentemente, la proporción en peso es de aproximadamente 75 miligramos de arginina/gramo de proteína total) y en el que otros aminoácidos complementados es la leucina y la proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido leucina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 100 a 200 miligramos de leucina/gramo de proteína total (preferentemente, aproximadamente 100 miligramos de leucina/gramo de proteína total).

50

55

En ciertas realizaciones, los alimentos medicinales contienen además una cantidad complementada del aminoácido tirosina. Preferentemente, la proporción en peso en los alimentos medicinales del aminoácido tirosina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 62 a 93 miligramos de tirosina/gramo de proteína total; más preferentemente, de aproximadamente 85 miligramos de tirosina/gramo de proteína total.

En algunas realizaciones, el peso total de los aminoácidos complementados adicionales en los alimentos medicinales es del aproximadamente 22 % al 38 % del peso total de la proteína de GMP y los aminoácidos complementados juntos. Los alimentos pueden complementarse además con otros aminoácidos, incluyendo

- histidina y triptófano. Preferentemente, en realizaciones que contienen además cantidades complementadas de los aminoácidos triptófano e histidina, el peso total de los aminoácidos complementarios adicionales es del aproximadamente 25 % al 42 % del peso total de la proteína del GMP y los aminoácidos complementados juntos. Opcionalmente, los alimentos medicinales no se complementan además con el aminoácido metionina.
- 5 En ciertas realizaciones, los alimentos medicinales englobados por la invención pueden dirigirse a trastornos metabólicos específicos variando la combinación preferida de aminoácidos complementarios adicionales contenidos en los alimentos. Por ejemplo, para el tratamiento de los trastornos del metabolismo de la fenilalanina tales como la fenilcetonuria, los alimentos contienen preferentemente cantidades complementadas de los aminoácidos arginina, leucina y tirosina además del GMP. Sin embargo, para el tratamiento de los trastornos del metabolismo de la tirosina tales como la tirosinemia, los alimentos no contendrían ninguna cantidad complementada de tirosina.
- 10 Los alimentos medicinales englobados por la invención pueden estar en forma de una variedad de productos alimentarios convencionales. Las formas preferidas incluyen bebidas, barras, obleas, púdines, gelatinas, galletas saladas, pieles de frutas, mantequillas de frutos secos, salsas, aderezos para ensaladas, cereales crujientes, copos, hojaldres, microgránulos o sólidos extruidos.
- 15 En ciertas realizaciones, los alimentos medicinales pueden tratarse térmicamente durante la producción, tal como, por ejemplo, horneando los alimentos. Los inventores han determinado que, durante el tratamiento térmico, los niveles de aminoácidos pueden disminuir; en particular, los niveles de aminoácidos de cualquier triptófano, tirosina, histidina, leucina o arginina añadidos. Por consiguiente, en algunas de dichas realizaciones, la cantidad de aminoácidos complementarios adicionales iniciales usados para preparar los alimentos medicinales es mayor que para los alimentos que no son tratados térmicamente, de modo que la proporción en peso final esté en los intervalos preferidos. Como ejemplos, en realizaciones preferidas, la proporción en peso inicial del aminoácido triptófano con respecto a la proteína total en el alimento medicinal antes del tratamiento térmico es superior a aproximadamente 12 miligramos de triptófano/gramo de proteína total, la proporción en peso inicial del aminoácido tirosina con respecto a la proteína total en el alimento medicinal antes del tratamiento térmico es superior a aproximadamente 85 miligramos de tirosina/gramo de proteína total, la proporción en peso inicial del aminoácido histidina con respecto a la proteína total en el alimento medicinal antes del tratamiento térmico puede ser superior a 23 miligramos de histidina/gramo de proteína total, la proporción en peso inicial del aminoácido leucina con respecto a la proteína total en el alimento medicinal antes del tratamiento térmico es superior a aproximadamente 100 miligramos de leucina/gramo de proteína total, y/o la proporción en peso inicial del aminoácido arginina con respecto a la proteína total en el alimento medicinal antes del tratamiento térmico es superior a aproximadamente 75 miligramos de arginina/gramo de proteína total.
- 20 35 En dichas realizaciones ilustrativas, los niveles iniciales de aminoácidos en los alimentos medicinales pueden ser tales que la proporción en peso final del aminoácido triptófano con respecto a la proteína total en el alimento medicinal tras el tratamiento térmico es de aproximadamente 12 a 14 miligramos de triptófano/gramo de proteína total, la proporción en peso final del aminoácido tirosina con respecto a la proteína total en el alimento medicinal tras el tratamiento térmico es de aproximadamente 62 a 93 miligramos de tirosina/gramo de proteína total, la proporción en peso final del aminoácido histidina con respecto a la proteína total en el alimento medicinal tras el tratamiento térmico es de aproximadamente 20 a 24 miligramos de histidina/gramo de proteína total, la proporción en peso final del aminoácido leucina con respecto a la proteína total en el alimento medicinal tras el tratamiento térmico es de aproximadamente 100 a 200 miligramos de leucina/gramo de proteína total y/o la proporción en peso final del aminoácido arginina con respecto a la proteína total en el alimento medicinal tras el tratamiento térmico es de aproximadamente 60 a 90 miligramos de arginina/gramo de proteína total.
- 40 45 Los alimentos medicinales de la invención que se usan en una dieta de tratamiento de la PKU deben contener niveles muy bajos de fenilalanina. Por consiguiente, en ciertas realizaciones preferidas, el GMP incluido en los alimentos medicinales contiene no más de 2,0 miligramos de contaminante de fenilalanina por gramo de proteína del GMP. Aunque se puede obtener un GMP de dicha pureza en un proveedor comercial, en ciertas dichas realizaciones, el GMP puede purificarse antes de incluirse en el alimento medicinal. Debido a la adición de cantidades complementadas de aminoácidos a los alimentos que no están presentes en el GMP purificado, en ciertas realizaciones preferidas, el alimento medicinal de la invención contiene menos de 1,5 miligramos de fenilalanina por gramo de proteína total. Ciertos ingredientes no proteicos, tales como el chocolate, pueden contribuir con cantidades traza de fenilalanina a los alimentos medicinales; por consiguiente, en ciertas realizaciones, los alimentos medicinales contienen de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 1,8 miligramos de fenilalanina por gramo de proteína total.
- 50 55 60 65 Los alimentos medicinales de la invención que se usan en el tratamiento de un trastorno del metabolismo de la tirosina deben contener niveles muy bajos de fenilalanina más tirosina. Por consiguiente, dichas realizaciones no contienen cantidades complementadas de tirosina. Preferentemente, en realizaciones para tratar un trastorno del metabolismo de la tirosina, el alimento medicinal contiene menos de 2,0 miligramos de fenilalanina y tirosina juntas por gramo de proteína total.
- En algunas realizaciones para el tratamiento de un trastorno del metabolismo de la tirosina que contiene cantidades

- complementadas de los aminoácidos arginina y leucina, el peso total de los aminoácidos complementados adicionales en los alimentos medicinales es del aproximadamente 16 % al 29 % del peso total de la proteína de GMP y los aminoácidos complementados juntos. En otras realizaciones más para tratar un trastorno del metabolismo de la tirosina, además de la leucina y la arginina, los alimentos medicinales contienen cantidades adicionales complementarias de los aminoácidos histidina y triptófano. Preferentemente, en dichas realizaciones, el peso total de los aminoácidos complementarios adicionales es del aproximadamente 19 % al 33 % del peso total de la proteína del GMP y los aminoácidos complementados juntos. Para mantener los niveles de complementación recomendados de los otros aminoácidos complementados en ausencia de tirosina, se puede añadir más GMP a los alimentos medicinales.
- En un segundo aspecto, la invención engloba un método de fabricación de un alimento medicinal para el tratamiento de un trastorno metabólico que es un trastorno metabólico de la fenilalanina, un trastorno metabólico de la tirosina, un trastorno metabólico del triptófano o un trastorno metabólico de la histidina, método que comprende las etapas de: proporcionar glicomacropéptido (GMP) y cantidades complementadas de dos o más aminoácidos, y mezclar los materiales proporcionados con uno o más ingredientes no proteicos para fabricar un alimento; en el que uno de los aminoácidos complementados es arginina, y la proporción en peso del aminoácido arginina proporcionado con respecto a la proteína total proporcionada es de aproximadamente 60 a 90 miligramos de arginina/gramo de proteína total (preferentemente, aproximadamente 75 miligramos de arginina/gramo de proteína total) y en el que el segundo aminoácido complementado es leucina, y la proporción en peso del aminoácido leucina proporcionado con respecto a la proteína total proporcionada es de aproximadamente 100 a 200 miligramos de leucina/gramo de proteína total (preferentemente, la proporción es de aproximadamente 100 miligramos de leucina/gramo de proteína total).
- En algunas realizaciones preferidas del método, también se proporciona una cantidad complementaria del aminoácido tirosina. Preferentemente, la proporción en peso del aminoácido tirosina proporcionado con respecto a la proteína total proporcionada es de aproximadamente 62 a 93 miligramos de tirosina/gramo de proteína total; más preferentemente, la proporción es de aproximadamente 85 miligramos de tirosina/gramo de proteína total. En algunas de dichas realizaciones, el peso total de los aminoácidos complementados adicionales es del aproximadamente 22 % al 38 % del peso total de proteína de GMP y los aminoácidos complementados juntos.
- En ciertas realizaciones, el método englobado por la invención se puede modificar para fabricar alimentos medicinales dirigidos a trastornos metabólicos específicos variando la combinación proporcionada de aminoácidos complementados. Por ejemplo, para preparar alimentos medicinales usados para el tratamiento de trastornos del metabolismo de la fenilalanina, tales como la fenilcetonuria, se proporcionan cantidades complementadas de los aminoácidos arginina, leucina y tirosina además del GMP.
- En ciertas realizaciones preferidas, el método incluye la etapa de purificación del GMP de manera que no contenga más de 2,0 mg de fenilalanina contaminante por gramo de proteína del GMP. En algunas de dichas realizaciones, la etapa de purificación del GMP puede realizarse mediante una o más de las siguientes técnicas: cromatografía de intercambio catiónico, ultrafiltración y diafiltración. Dichas realizaciones también pueden incluir una etapa adicional de secado del GMP purificado mediante liofilización o secado por pulverización.
- Ciertas realizaciones pueden incluir la etapa adicional de dejar que el alimento se estabilice para formar un pudín, gelatina, o piel de frutas. Otras realizaciones pueden incluir la etapa de formar el alimento en forma de una barrita, una galleta salada, un copo, una hojaldre o un microgránulo, o extruir el alimento en forma de un sólido extruido.
- Ciertas realizaciones pueden incluir la etapa adicional del tratamiento térmico de la mezcla proporcionado al fabricar el alimento. Un ejemplo de dicha etapa es hornear el alimento en un horno u otra cámara calentada. Los inventores han determinado que ciertos aminoácidos, incluyendo tirosina, triptófano, arginina, leucina e histidina, se pierden o se degradan durante el tratamiento térmico. Por consiguiente, en dichas realizaciones, se prefiere que las cantidades iniciales de los aminoácidos complementarios adicionales usados para fabricar los alimentos medicinales se proporcionen a niveles más altos que para los alimentos que no se tratan térmicamente, de modo que a medida que los aminoácidos se pierden o se degradan a través del tratamiento térmico, la proporción en peso final se encuentra dentro de los intervalos preferidos.
- Como ejemplo, en realizaciones preferidas, la proporción en peso inicial del aminoácido triptófano proporcionado con respecto a la proteína total proporcionada antes del tratamiento térmico puede ser superior a aproximadamente 12 miligramos de triptófano/gramo de proteína total; la proporción en peso inicial del aminoácido tirosina proporcionado con respecto a la proteína total proporcionada antes del tratamiento térmico puede ser superior a aproximadamente 85 miligramos de tirosina/gramo de proteína total; la proporción en peso inicial del aminoácido histidina proporcionado con respecto a la proteína total proporcionada antes del tratamiento térmico puede ser superior a 23 miligramos de histidina/gramo de proteína total; la proporción en peso inicial del aminoácido leucina proporcionado con respecto a la proteína total proporcionada antes del tratamiento térmico puede ser superior a aproximadamente 100 miligramos de leucina/gramo de proteína total; y/o la proporción en peso inicial del aminoácido arginina proporcionado con respecto a la proteína total proporcionada antes del tratamiento térmico puede ser superior a aproximadamente 75 miligramos de arginina/gramo de proteína total.

Durante el tratamiento térmico, estos niveles de aminoácidos en el alimento pueden disminuir. Se prefiere que la proporción en peso final del aminoácido triptófano con respecto a la proteína total en el alimento medicinal después del tratamiento térmico sea de aproximadamente 12 a 14 miligramos de triptófano/gramo de proteína total; la proporción en peso final del aminoácido tirosina con respecto a la proteína total en el alimento medicinal después del tratamiento térmico sea de aproximadamente 62 a 93 miligramos de tirosina/gramo de proteína total; la proporción en peso final del aminoácido histidina con respecto a la proteína total en el alimento medicinal después del tratamiento térmico sea de aproximadamente 20 a 24 miligramos de histidina/gramo de proteína total; la proporción en peso final del aminoácido leucina con respecto a la proteína total en el alimento medicinal después del tratamiento térmico es de aproximadamente 100 a 200 miligramos de leucina/gramo de proteína total; y/o la proporción en peso final del aminoácido arginina con respecto a la proteína total en el alimento medicinal después del tratamiento térmico es de aproximadamente 60 a 90 miligramos de arginina/gramo de proteína total.

La invención se puede aplicar a métodos de tratamiento de un trastorno metabólico, que es un trastorno del metabolismo de la fenilalanina, un trastorno del metabolismo de la tirosina, un trastorno del metabolismo del triptófano o un trastorno del metabolismo de la histidina. Estos métodos incluyen la etapa de administrar a un ser humano que tiene un trastorno metabólico un alimento medicinal que contiene glicomacropéptido (GMP) y cantidades complementadas adicionales de dos o más aminoácidos, incluyendo arginina y leucina. La proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido arginina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 60 a 90 miligramos de arginina/gramo de proteína total; preferentemente, la proporción es de aproximadamente 75 miligramos de arginina/gramo de proteína total. La proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido leucina con respecto a la proteína es de aproximadamente 100 a 200 miligramos de leucina/gramo de proteína total; preferentemente, aproximadamente 100 miligramos de leucina/gramo de proteína total.

En dichas realizaciones en las que el alimento medicinal no se complementa además con tirosina, el ser humano tratado con el alimento medicinal puede tener un trastorno del metabolismo de la tirosina, incluyendo sin limitación, tirosinemia de tipo I, tirosinemia de tipo II, tirosinemia de tipo III/Hawkinsinuria, o Alcaptonuria/Ocronosis. En dichas realizaciones, el alimento medicinal contiene preferentemente menos de 2,0 miligramos de fenilalanina y tirosina juntas por gramos de proteína total.

En otras realizaciones más, el alimento medicinal administrado contiene además una cantidad complementada del aminoácido tirosina. Preferentemente, la proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido tirosina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 62 a 93 miligramos de tirosina/gramo de proteína total; más preferentemente, la proporción es de aproximadamente 85 miligramos de tirosina/gramo de proteína total. En dichas realizaciones, el ser humano tratado con el alimento medicinal puede tener un trastorno del metabolismo de la fenilalanina, que incluye fenilcetonuria (PKU), un trastorno del metabolismo del triptófano, que incluye hipertriptofanemia o un trastorno del metabolismo de la histidina, que incluye carnosinemia, histidinemia o aciduria urocánica. En realizaciones en las que se trata un ser humano con un trastorno del metabolismo del triptófano, el alimento medicinal administrado no contiene cantidades complementadas de triptófano. En realizaciones en las que se trata a un ser humano con un trastorno del metabolismo de la histidina, el alimento medicinal administrado no contiene cantidades complementadas de histidina.

En realizaciones en las que el ser humano que se está tratando tiene un trastorno de metabolismo de la fenilalanina, el ser humano es preferentemente de al menos dos años de edad. Preferentemente, el alimento medicinal administrado contiene menos de 1,5 miligramos de fenilalanina por gramo de proteína total.

Estas y otras características de la presente invención serán evidentes para el experto en la materia a partir de la siguiente descripción detallada considerada conjuntamente con los dibujos adjuntos.

#### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra el peso corporal en función del tiempo en ratones WT destetados alimentados con dietas que contienen caseína, GMP complementado con IAA limitante (GMP adecuado) o GMP complementado con IAA limitante excepto Phe (deficiente en GMP Phe) durante un período de 42 días. Los valores son las medias ± ETM; n = 10. Se añadió Phe al agua potable para el grupo con deficiencia de GMP Phe (1 g de Phe/l) en el d 4 hasta el final del estudio. No hubo diferencias significativas para los cambios en el peso corporal diario desde el d 14 hasta el d 42.

La Fig. 2 muestra la concentración de Phe en 5 cortes de cerebro, cerebelo, tronco encefálico, hipotálamo, corteza parietal y corteza piriforme anterior, de ratones con PKU alimentados con la dieta de GMP o de aminoácidos (AA) durante 47 d. Los valores son las medias ± ETM; n = 8. \*Diferente de los AA, p ≤ 0,001. La Fig. 3 muestra los niveles de Phe del cerebelo para ratones con PKU alimentados con la dieta de GMP o aminoácidos (AA) durante 47 d en función de los niveles de treonina (Thr) + isoleucina (Iso) + valina (Val) en plasma.

La Figura 4 muestra el perfil de aminoácidos del glicomacropéptido (BioPURE-GMP, Davisco Foods International Inc., LeSueur, MN) y caseína (ALACID; New Zealand Milk Products, Santa Rosa, CA) expresado como g de aminoácido por 100 g de producto.

La Figura 5 muestra las concentraciones medias de Phe obtenidas tras un ayuno nocturno antes del desayuno

de un solo sujeto con PKU alimentado con una dieta de aminoácidos (AA) o glicomacropéptidos (GMP) durante 15 semanas en el hogar. Se muestran los datos de 6 semanas del período de estudio de 15 semanas cuando solo se proporcionaron al sujeto los alimentos con contenido conocido de Phe: semanas 3 y 15 (dieta de AA) y semanas 4, 7, 11 y 13 (dieta de GMP). Las concentraciones de Phe en sangre y plasma se corrigieron para la ingesta de Phe y se expresaron como mmol de Phe/l por 100 mg de ingesta de Phe. La concentración de Phe se determinó usando uno de dos métodos, la recogida de puntos de sangre analizados con espectroscopía de masas en tandem (MS/MS) y la medición de la Phe en plasma con un analizador de AA. Los valores son las medias ± ET; dieta de AA ( $n = 4$  Phe en plasma y  $n = 4$  Phe en sangre), dieta de GMP ( $n = 4$  Phe en plasma y  $n = 8$  Phe en sangre). \*Diferente de la dieta de AA,  $p < 0,05$ .

La Figura 6 muestra la concentración de aminoácidos totales (AA) y de nitrógeno ureico en sangre en plasma postprandial con la ingesta del glicomacropéptido (GMP) o la dieta de AA. El plasma se obtuvo 2,5 h después de desayunar;  $n = 11$  a excepción del nitrógeno ureico en sangre en los días de estudio 5 y 6, para los que  $n = 6$ . Los AA en plasma totales indican la suma de todos los AA medidos en plasma. Los valores son medias ± ETM. Los AA en plasma totales aumentaron y el nitrógeno ureico en sangre disminuyó con la ingesta de la dieta de GMP en comparación con el día 4 de la dieta de AA. Hubo un efecto significativo del tiempo en el ANOVA de medidas repetidas. \*Significativamente diferente de la dieta de AA en el día 4,  $p < 0,05$  (prueba t pareada, emparejamiento en el sujeto).

La Figura 7 muestra las concentraciones de fenilalanina en plasma de sujetos individuales con fenilcetonuria ( $n = 11$ ) tras consumir la dieta de aminoácidos (AA) o la dieta de glicomacropéptido (GMP) durante 4 d. Se obtuvo sangre 2,5 h después de tomarse el desayuno, y se aisló plasma para el análisis del perfil completo de AA. Los sujetos mostraron un intervalo de concentraciones en plasma de fenilalanina tras el consumo de la dieta de AA o la dieta de GMP durante 4 días. No hubo diferencias significativas en la concentración de la fenilalanina en plasma cuando se comparó el último día de la dieta de AA (día 4) con el último día de la dieta de GMP (día 8);  $p = 0,173$  mediante la prueba t pareada, emparejamiento en el sujeto. La media ± ETM del grupo fue de  $619 \pm 82 \mu\text{mol/l}$  (dieta de AA) y  $676 \pm 92 \mu\text{mol/l}$  (dieta de GMP). El cambio medio en la concentración de fenilalanina en plasma fue de  $57 \pm 52 \mu\text{mol/l}$  de phe, fenilalanina.

La Figura 8 muestra la concentración de fenilalanina en el postprandial (PP; 2,5 h después del desayuno) en comparación con el ayuno (ayuno, ayuno nocturno) en sujetos con fenilcetonuria alimentados con glicomacropéptido (GMP) en comparación con la dieta de aminoácidos (AA) durante 4 días. Se muestran las medias del grupo y la respuesta de sujetos individuales;  $n = 6$  (día 4 en comparación con el día 8). No hubo un cambio significativo en la concentración en plasma de la fenilalanina en comparación con el ayuno con las concentraciones de PP al consumir la dieta de GMP ( $p = 0,349$ ); sin embargo, la dieta de AA mostró un aumento significativo en la concentración en plasma de fenilalanina ( $p = 0,048$ ) mediante la prueba t pareada, apareamiento en el sujeto. Phe, fenilalanina.

La Figura 9 muestra las concentraciones de treonina e isoleucina en plasma postprandial tras consumir la dieta de glicomacropéptido (GMP) durante 4 d (días 5-8). Los valores son la media ± ETM;  $n = 11$ , de plasma obtenido 2,5 h después del desayuno. Para los días 3 y 4 del estudio, todos los sujetos consumieron una dieta de aminoácidos (AA); en los días 5-8, toda la fórmula de AA fue reemplazada por productos alimentarios de GMP. Hubo un efecto significativo del tiempo en el ANOVA de medidas repetidas. \*Significativamente diferente del último día de la dieta de AA (día 4),  $p < 0,05$  (prueba t pareada, emparejamiento en el sujeto). \*\*significativamente diferente del último día de la dieta de AA (día 4),  $p < 0,0001$ . No hubo un aumento significativo adicional en la concentración en plasma de isoleucina y treonina después de los días 5 y 7, respectivamente. Ile, isoleucina; Thr, treonina.

La Figura 10 muestra el perfil de aminoácidos del pudín de fresa con GMP en comparación con la fórmula de aminoácidos (Phlexy-10 Drink Mix, SHS North America, Rockville, MD, EE.UU.). Los valores son la media ± ET. El tamaño de la muestra fue  $n = 2$ . La misma letra sobre las barras del pudín de fresa con GMP y de los aminoácidos indican que los valores no son estadísticamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

La Figura 11 es un gráfico de barras que muestra clasificaciones de aceptabilidad usando cuatro criterios diferentes (olor, sabor, retrogusto y global) tanto para Bettermilk™, un alimento de GMP de la presente invención, como para Phenex-2™, una fórmula de aminoácidos comúnmente usada. Se promedian las calificaciones entre 27 adultos sin PKU (barras sin sombrear) y 4 adultos con PKU (barras sombreadas). Los valores son la media ± ET; \*  $p \leq 0,01$ , prueba t pareada. La clasificación de aceptabilidad es: 1 - me desagrada enormemente; 2 - me desagrada mucho, 3 - no me gusta, 4 - me desagrada un poco, 5 - me gusta un poco, 6 - me gusta, 7 - me gusta mucho y 8 - me encanta.

La Figura 12 es un gráfico de barras que muestra las concentraciones en plasma de grelina, insulina y aminoácidos para sujetos con PKU cuando reciben en una dieta de GMP y en una dieta de aminoácidos. Los valores de grelina e insulina representan volúmenes iguales de plasma combinados para cada sujeto desde los días 3 + 4 para el desayuno de AA, los días 7 + 8 para el desayuno de GMP. Suma de los valores en plasma de AA postprandiales (PP) en el último día de la dieta de AA (día 4) y el último día de la dieta de GMP (día 8). Todos los valores son medias ± ETM;  $n = 6$  para los valores en ayuno de grelina. \*Indica significativamente diferente de la grelina postprandial con desayuno de AA ( $p = 0,03$ , prueba t pareada, emparejamiento en el sujeto,  $n = 10$ ). \*\*Indica una diferencia moderadamente significativa de la insulina con el desayuno de AA ( $p = 0,053$ , prueba t pareada, emparejamiento con el sujeto,  $n = 10$ ). \*\*\*Indica significativamente diferente de la suma de los AA en plasma con el desayuno de AA ( $p = 0,049$ , prueba t pareada, emparejamiento con el sujeto,  $n = 11$ ).

La Figura 13 es un gráfico de la relación entre las concentraciones de grelina en plasma 180 min después del inicio del desayuno (eje x) y la sensación de plenitud 2 h después del desayuno (eje y) para sujetos con PKU

tanto en dietas de GMP (círculos vacíos) como de aminoácidos (círculos llenos). La grelina postprandial más baja se asoció con una mayor sensación de plenitud. Las líneas representan líneas de regresión de mínimos cuadrados ajustadas a datos de tratamiento de dieta individual; el desayuno de AA es línea discontinua y el desayuno de GMP es de línea continua. Las líneas son significativamente diferentes. Usando la eliminación regresiva con un modelo de efectos mixtos, el mejor modelo de predicción de las puntuaciones de plenitud postprandial incluyó el tratamiento con la dieta, la grelina postprandial y la interacción entre la grelina y el tratamiento con la dieta.

#### **Descripción detallada de la invención**

##### I. EN GENERAL

Se ha de señalar que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Además, los términos "un" (o "una"), "uno/a o más" y "al menos uno/a" se pueden usar indistintamente en el presente documento. También se ha de señalar que las expresiones "que comprende", "que incluye" y "que tiene" se pueden usar indistintamente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados comúnmente entendidos por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente invención, a continuación, se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las referencias citadas en la presente memoria descriptiva deben tomarse como indicativas del nivel de habilidad en la técnica. Nada en el presente documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tenga derecho a anteceder a dicha divulgación en virtud de la invención anterior.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo del 10 % por debajo al 10 % por encima de un valor dado.

Como se usa en el presente documento, la expresión "alimento medicinal" significa "un alimento que se formula para ser consumido o administrado por vía enteral bajo la supervisión de un médico y que está destinado al tratamiento dietético específico de una enfermedad o afección para la que hay establecidos requisitos nutricionales distintivos, basándose en principios científicos reconocidos, mediante evaluación médica" (del apartado 5(b) de la Ley de Medicamentos Huérfanos, 21 USC 360ee (b) (3)). Los alimentos medicinales se distinguen de la categoría más amplia de alimentos de uso dietético especial y de los alimentos que afirman ser saludables en el requisito de que los alimentos medicinales pretenden cubrir las necesidades nutricionales distintivas de una enfermedad o afección, se usan bajo supervisión médica y están destinados al tratamiento dietético específico de una enfermedad o afección.

La expresión "alimentos medicinales" no se refiere a todos los alimentos suministrados a pacientes enfermos. Los alimentos medicinales son alimentos que están especialmente formulados y procesados (a diferencia de un alimento natural que se usa en estado natural) para el paciente que está gravemente enfermo o que requiere el producto como una modalidad de tratamiento principal. Para considerarse un alimento medicinal, un producto debe, como mínimo, cumplir con los siguientes criterios: el producto debe ser un alimento para alimentación oral o por sonda; el producto debe estar etiquetado para el tratamiento dietético de un trastorno, enfermedad o afección médicos específicos para los que existen necesidades nutricionales distintivas; y el producto debe estar destinado a su uso bajo supervisión médica (de la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU., Guidance for Industry: Frequently Asked Questions About Medical Foods, Center for Food Safety and Applied Nutrition, mayo de 2007).

Como se usa en el presente documento, una "cantidad complementada" de un aminoácido se refiere a la cantidad de aminoácido que se añade a una mezcla o que está contenida en un alimento que no procede de (a) la contaminación traza de la proteína del GMP; o (b) cantidades traza de aminoácidos contenidos en productos no proteicos. Un ejemplo de un producto no proteico es el chocolate, que tiene cantidades traza de Phe, pero que no se reconoce como una fuente significativa de proteína o aminoácidos. Las cantidades complementadas pueden proceder de cualquier otra fuente que se reconoce que contiene cantidades significativas de un aminoácido o de una proteína dado que contiene el aminoácido, incluyendo los complementos de aminoácidos comerciales.

Como se usa en el presente documento, "proteína total" de un alimento significa el agregado de la proteína del GMP del alimento y la proteína de aminoácidos complementarios adicionales del alimento.

A lo largo de la presente divulgación, se usan las siguientes abreviaturas: AA, aminoácido; Ala, alanina; Arg, arginina; Asn, asparagina; Asp, ácido aspártico; PC, peso corporal; Cys, cisteína; ADR, aportes dietéticos de referencia de referencia; Gln, glutamina; Glu, ácido glutámico; Gly, glicina; GMP, glicomacropéptido; His, histidina; IAA, aminoácido indispensable; Iso o Ile, isoleucina; Leu, leucina; AANG, aminoácidos neutros grandes; Met, metionina; MS/MS, espectroscopía de masas en tandem; PAH, fenilalanina hidroxilasa; EP, equivalente de proteína; Phe, fenilalanina; PKU, fenilcetonuria; Pro, prolina; ETM, error típico de la media; Ser, serina; Thr, treonina; Tyr,

tirosina; Trp, triptófano; Val, valina; WT, tipo salvaje.

## II. LA INVENCIÓN

5 Los inventores han determinado recientemente que los alimentos medicinales hechos con proteína de glicomacropéptido complementada con cantidades adicionales de los aminoácidos arginina, histidina, leucina y, opcionalmente, otros aminoácidos, como la fuente de aminoácidos/proteínas contenida en los alimentos, proporcionan una fuente completa de proteína baja en Phe en la dieta para individuos con PKU u otros trastornos metabólicos. Estos alimentos son más apetecibles que las fórmulas convencionales de AA y optimizan la capacidad de GMP para reducir los niveles de Phe en la sangre y el cerebro. Por consiguiente, la presente invención proporciona alimentos medicinales, métodos de preparación de dichos alimentos y métodos de administración de dichos alimentos como una fuente de proteína para individuos con trastornos metabólicos tales como PKU.

10 En un aspecto, la invención proporciona alimentos medicinales que contienen una fuente de proteína baja en Phe completa. La fuente de proteína primaria de los alimentos medicinales de la presente invención es el glicomacropéptido (GMP), una proteína natural que no contiene Phe en su forma pura. El GMP se forma durante la fabricación del queso, cuando la quimosina escinde específicamente la κ-caseína entre los restos de aminoácidos 105 a 106. La para-κ-caseína (restos 1 a 105) se coagula, formando cuajada de queso, mientras que el GMP (restos 106 a 169) permanece en el suero de la leche. El GMP es altamente polar y es glicosilado por la galactosamina, la galactosa y el ácido o-sialico en uno o más sitios de aminoácidos de treonina.

15 "Proteína del GMP" se refiere al polipéptido del GMP puro sin los restos de glicosilación. La proteína del GMP contiene un 47% (p/p) de aminoácidos indispensables, pero no contiene histidina (His), triptófano (Trp), tirosina (Tyr), arginina (Arg), cisteína (Cys) ni Phe.

20 25 Se puede usar una serie de métodos para aislar el GMP del suero de la leche. Se pueden encontrar ejemplos detallados de métodos de purificación, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 5.968.586. Las tecnologías actuales a gran escala para aislar el GMP del suero de la leche usan la cromatografía de intercambio iónico o la ultrafiltración. El GMP tiene un punto isoeléctrico (pI) por debajo de 3,8, mientras que otras proteínas principales del suero tienen 30 valores de pI superiores a 4,3. Esta diferencia fisicoquímica entre el GMP y otras proteínas del suero de la leche se usa comúnmente en procesos de aislamiento para separar el GMP del suero de la leche.

35 40 El GMP disponible en el mercado contiene contaminantes de Phe de proteínas del suero de la leche residual. La cantidad de contaminación por Phe en el GMP comercial varía ampliamente (es decir, 5 mg de Phe/g de producto, literatura del fabricante, Davisco Foods Intl., Eden Prairie, Minn., EE. UU.; 2,0 mg de Phe/g de producto, literatura del fabricante de Lacprodan cGMP-20, Arla Alimentos, Arhus, Dinamarca). La fórmula tradicional de aminoácidos está exenta de Phe, lo que permite que un individuo con PKU consuma alimentos naturales que contengan Phe para cumplir con su asignación diaria. El GMP preferido para su uso en la presente invención contiene no más de 2,0 mg de Phe/g de GMP.

45 50 En ciertas realizaciones preferidas, el GMP obtenido del mercado puede purificarse para eliminar los contaminantes de Phe antes de su uso en los alimentos medicinales de la presente invención. Los posibles procesos de purificación son bien conocidos en la técnica, e incluyen atrapar proteínas del suero de la leche contaminantes en el GMP en bruto por adsorción sobre una resina de intercambio catiónico y recoger el GMP purificado en la fracción de flujo continuo. Se pueden usar técnicas adicionales conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, ultrafiltración/diafiltración (UF/DF), para concentrar el GMP y separar por lavado los péptidos, las sales y el nitrógeno no proteico. Después de las etapas de purificación y de concentración, se puede usar una serie de técnicas conocidas en la técnica para secar el GMP concentrado y purificado, que incluyen la liofilización y el secado por pulverización.

55 60 El GMP puro no contiene His, Tyr, Trp, Cys, Arg ni Phe, y es bajo en leucina (Leu). His, Trp, Phe y Leu son todos aminoácidos indispensables. Tyr y Arg son aminoácidos condicionalmente indispensables, porque la Phe es un precursor de Tyr, y el glutamato, la prolina y el aspartato son precursores de Arg. Como resultado de ello, el GMP como una fuente de proteína primaria en los alimentos debe complementarse para proporcionar una proteína nutricionalmente completa. Los inventores han determinado intervalos óptimos para cantidades complementadas de los aminoácidos arginina, leucina y tirosina que son diferentes de lo que se había sugerido previamente en la técnica.

65 70 Por consiguiente, en ciertas realizaciones preferidas, la presente invención incluye alimentos medicinales para el tratamiento de un trastorno metabólico en el que los alimentos medicinales contienen glicomacropéptido (GMP) y cantidades complementadas optimizadas adicionales de los aminoácidos arginina, leucina y/o tirosina. También se pueden incluir otros aminoácidos en los alimentos medicinales de la invención. Sin embargo, debido a que los inventores han determinado que la complementación con metionina no es necesaria y, de hecho, volverían los alimentos medicinales menos apetecibles, en ciertas realizaciones preferidas, los alimentos medicinales de la invención no contienen una cantidad complementada adicional del aminoácido metionina. Los aminoácidos aprobados para su uso en productos alimentarios se pueden obtener a partir de una variedad de fuentes

comerciales conocidas en la técnica.

- La proporción en peso preferida dentro del alimento medicinal de cada aminoácido complementado se expresa en las unidades de miligramos de ese aminoácido en el alimento medicinal final por gramo de proteína total, donde un gramo de proteína total se define como la suma de la proteína de GMP (g de nitrógeno x 6,25) y de los aminoácidos complementados adicionales (g de nitrógeno x 6,25). En ciertas realizaciones preferidas, el peso total de los aminoácidos complementados adicionales es preferentemente del aproximadamente 22 % al 38 % del peso total de la proteína del GMP, y los aminoácidos complementados se añaden juntos.
- 5 La proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido arginina con respecto a la proteína es de aproximadamente 60 a 90 miligramos de arginina/gramo de proteína total; preferentemente, la proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido arginina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 75 miligramos de arginina/gramo de proteína total.
- 10 La proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido leucina con respecto a la proteína es de aproximadamente 100 a 200 miligramos de leucina/gramo de proteína total; preferentemente, la proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido leucina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 100 miligramos de leucina/gramo de proteína total.
- 15 La proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido tirosina, la proporción en peso preferida en los alimentos medicinales del aminoácido tirosina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 62 a 93 miligramos de tirosina/gramo de proteína total; más preferentemente, la proporción en peso en los alimentos medicinales del aminoácido tirosina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 85 miligramos de tirosina/gramo de proteína total.
- 20 25 En las realizaciones que contienen cantidades complementadas de tirosina, la proporción en peso preferida en los alimentos medicinales del aminoácido tirosina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 62 a 93 miligramos de tirosina/gramo de proteína total; más preferentemente, la proporción en peso en los alimentos medicinales del aminoácido tirosina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 85 miligramos de tirosina/gramo de proteína total.
- 30 35 En ciertas realizaciones, los alimentos medicinales pueden contener opcionalmente aminoácidos complementados adicionales. Por ejemplo, se pueden incluir histidina y/o triptófano en los alimentos medicinales. Para la complementación con histidina, la proporción en peso preferida en los alimentos medicinales de histidina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 20 a 24 miligramos de histidina/gramo de proteína total; más preferentemente, la proporción en peso en los alimentos medicinales del aminoácido histidina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 23 miligramos de histidina/gramo de proteína total.
- Para la complementación con triptófano, la proporción en peso preferida en los alimentos medicinales de triptófano con respecto a la proteína total es de aproximadamente 12 a 14 miligramos de triptófano/gramo de proteína total; más preferentemente, la proporción en peso en los alimentos medicinales del aminoácido triptófano con respecto a la proteína total es de aproximadamente 12 miligramos de triptófano/gramo de proteína total.
- 40 45 En ciertas realizaciones, los alimentos medicinales pueden ser complementados además con vitaminas y minerales esenciales, proporcionando una complementación nutricional no proteica necesaria además de una fuente de proteína completa. Además, los alimentos medicinales pueden contener una variedad de otras sustancias bajas en Phe que normalmente están contenidas en alimentos convencionales (ingredientes no proteicos).
- 50 55 La invención no se limita a alimentos medicinales para el tratamiento de trastornos del metabolismo de Phe tales como la PKU; en su lugar, los alimentos medicinales de la invención incluyen además alimentos para el tratamiento de un trastorno del metabolismo de otros aminoácidos que no están presentes en el GMP (es decir, trastornos del metabolismo de His, Trp, Tyr o Phe). Para las realizaciones usadas en el tratamiento de los trastornos del metabolismo de la tirosina, tales como la tirosinemia, las cantidades complementadas óptimas de arginina y leucina se incluyen en los alimentos, pero no se incluye una cantidad complementada de tirosina. Para ajustar la tirosina perdida, se puede aumentar la cantidad de GMP. En algunas de dichas realizaciones, el peso total de los aminoácidos complementados adicionales es preferentemente del aproximadamente 16 % al 29 % del peso total de la proteína del GMP y los aminoácidos complementados añadidos juntos. Preferentemente, la cantidad de tirosina más fenilalanina juntas, en dichas realizaciones, es inferior a 2,0 mg por gramo de proteína total.
- 60 Los alimentos medicinales de la presente invención engloban una amplia variedad de tipos de alimentos, incluyendo una fórmula, una bebida, un barritas, una oblea, un pudín, una gelatina, una galleta salada, una piel de fruta, una mantequilla de frutos secos, una salsa, un aderezo para ensalada, un copo, un trozo de cereal crujiente, un hojaldre, un microgránulo o un sólido extruido. Estos y otros posibles tipos de alimentos serían fácilmente reconocidos por los expertos en la materia, y se podrían usar los métodos de fabricación convencionales para preparar los alimentos medicinales de la invención usando los ingredientes de la invención junto con otras sustancias bajas en Phe usadas normalmente en alimentos convencionales.
- Una serie de los posibles tipos de alimentos englobados por la invención están sujetos a un tratamiento térmico durante la producción. Como ejemplo, se pueden hornear galletas saladas, barritas y cereales crujientes. Los sólidos extruidos pueden calentarse antes de la extrusión. Las pieles de frutas, las salsas y los cereales crujientes se pueden preparar calentando una mezcla antes de enfriarla y, en algunos casos, secando el producto final. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los alimentos medicinales de la invención se tratan térmicamente durante la

producción.

Los inventores han determinado que el tratamiento térmico puede conducir a una pérdida significativa de los aminoácidos complementados adicionales. Por ejemplo, los aminoácidos libres tales como Trp, Tyr, His, Leu y Arg

- 5 pueden experimentar la reacción de Maillard. La exposición a la luz puede acelerar la reacción de fotodegradación de Tyr. La pérdida de los aminoácidos complementados adicionales mediante tratamiento térmico o exposición a la luz aumentaría la cantidad de aminoácidos complementados adicionales que se debe añadir a los alimentos medicinales. Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas, la proporción en peso inicial de cada aminoácido complementado sería superior para los alimentos que son tratados térmicamente que para los alimentos que no son tratados térmicamente, de manera que tras la pérdida, la cantidad restante final de cada aminoácido complementado estaría en la proporción en peso preferida.
- 10

En otro aspecto, la invención engloba un método de fabricación de alimentos medicinales para el tratamiento de un trastorno metabólico tal como la PKU. El método incluye las etapas de proporcionar glicomacropéptido (GMP) y cantidades adicionales complementadas de aminoácidos incluyendo arginina y leucina, y mezclar los materiales proporcionados con otras sustancias para fabricar los alimentos. La proporción en peso del aminoácido arginina proporcionado con respecto a la proteína proporcionada es de aproximadamente 60 a 90 miligramos de leucina/gramo de proteína total, preferentemente de aproximadamente 75 miligramos de arginina/gramo de proteína total. La proporción en peso del aminoácido leucina proporcionado con respecto a la proteína total proporcionada es de aproximadamente 100 a 200 miligramos de leucina/gramo de proteína total, preferentemente de aproximadamente 100 miligramos leucina/gramo de proteína total.

15

Como se ha descrito anteriormente, se puede usar una variedad de otras sustancias en la fabricación de los alimentos, incluyendo ingredientes no proteicos normalmente usados para fabricar alimentos convencionales. Las 20 otras sustancias usadas, sin embargo, deben ser sustancias bajas en Phe o exentas de Phe.

25

En algunas realizaciones, se prefiere que el peso total de los aminoácidos complementados adicionales en el método sea del aproximadamente 22 % al 38 % del peso total de la proteína del GMP y los aminoácidos complementados juntos. El método engloba técnicas convencionales usadas para fabricar una variedad de tipos de 30 alimentos. Como ejemplos, se puede dejar que la mezcla alimentaria se estabilice formando un pudín, una gelatina o piel de fruta; la mezcla alimentaria puede formarse en una barrita, una galleta salada, un copo, un hojaldre o una microgránulo; o el alimento puede extruirse en forma de un sólido extruido. En algunas realizaciones del método, la mezcla alimentaria se trata con calor. Los ejemplos de tratamiento térmico incluyen hornear la mezcla alimentaria, pasteurizar la mezcla alimentaria, hervir la mezcla de calor o someter la mezcla a extrusión en caliente.

35

En ciertas realizaciones del método, la proporción en peso del aminoácido tirosina proporcionada con respecto a la proteína proporcionada es de aproximadamente 62 a 93 miligramos de tirosina/gramo de proteína total, preferentemente de aproximadamente 85 miligramos de tirosina/gramo de proteína total.

40 En ciertas realizaciones del método, la proporción en peso del aminoácido histidina proporcionado con respecto a la proteína proporcionada es de aproximadamente 20 a 24 miligramos de histidina/gramo de proteína total, preferentemente de aproximadamente 23 miligramos de histidina/gramo de proteína total.

45 En ciertas realizaciones del método, la proporción en peso en el alimento del aminoácido triptófano con respecto a la proteína es de aproximadamente 12 a 14 miligramos de triptófano/gramo de proteína total, preferentemente de aproximadamente 12 miligramos de triptófano/gramo de proteína total.

El método también puede incluir la etapa de purificar el GMP de manera que no contenga más de 2,0 mg de fenilalanina contaminante por gramo de proteína del GMP. Se puede usar una variedad de técnicas conocidas en la 50 técnica para purificar el GMP, que incluyen el uso de cromatografía de intercambio catiónico, ultrafiltración y diafiltración. El GNP purificado puede secarse más usando una cualquiera de una serie de técnicas de secado conocidas, que incluyen, sin limitación, liofilización o secado por pulverización.

55 La invención se puede aplicar a un método de tratamiento de un trastorno metabólico. Este método incluye las etapas de seleccionar a un paciente con un trastorno metabólico y administrar al paciente un alimento medicinal que comprenda glicomacropéptido (GMP) y cantidades complementadas óptimas adicionales de los aminoácidos arginina y leucina. Preferentemente, la proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido arginina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 60 a 90 miligramos de arginina/gramo de proteína total, más preferentemente aproximadamente 75 miligramos de arginina/gramo de proteína total. Preferentemente, la proporción en peso en el alimento del aminoácido leucina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 100 a 200 miligramos de leucina/gramo de proteína total, más preferentemente aproximadamente 100 miligramos de leucina/gramo de proteína total.

60

65 El trastorno metabólico es uno de un trastorno del metabolismo de Phe, un trastorno del metabolismo de His, un trastorno del metabolismo de Trp, un trastorno del metabolismo de Tyr o un trastorno del metabolismo de Phe. En algunas realizaciones, el peso total de los aminoácidos complementados adicionales en el alimento medicinal

administrado es del aproximadamente 22 % al 38 % del peso total de la proteína del GMP y aminoácidos complementados juntos.

5 En ciertas realizaciones del método, el alimento medicinal no está complementado con tirosina, y el paciente seleccionado tiene un trastorno del metabolismo de la tirosina. En dichas realizaciones, el alimento medicinal contiene preferentemente menos de 2,0 miligramos de fenilalanina más tirosina por gramo de proteína total. En algunas de dichas realizaciones, el peso total de los aminoácidos complementados adicionales en el alimento medicinal administrado es del aproximadamente 16 % al 29 % del peso total de la proteína del GMP y aminoácidos complementados juntos.

10 10 En ciertas realizaciones del método, los alimentos medicinales usados en el método contienen además cantidades complementadas óptimas adicionales del aminoácido tirosina. Preferentemente, la proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido tirosina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 62 a 93 miligramos de tirosina/gramo de proteína total, más preferentemente de aproximadamente 85 miligramos de tirosina/gramo de proteína total.

15 15 Si se incluyen cantidades óptimas de arginina, leucina y tirosina, el paciente seleccionado puede tener un trastorno del metabolismo de la fenilalanina, un trastorno del metabolismo de la histidina o un trastorno del metabolismo del triptófano. Si el paciente tiene un trastorno del metabolismo de la histidina, el alimento medicinal administrado no contiene una cantidad complementada de histidina. Si el paciente tiene un trastorno del metabolismo del triptófano, el alimento medicinal administrado no contiene una cantidad complementada de triptófano.

20 Conforme a las limitaciones indicadas anteriormente, se pueden incluir opcionalmente otros aminoácidos en los alimentos medicinales usados en el método. En ciertas realizaciones del método, la proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido histidina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 20 a 24 miligramos de histidina/gramo de proteína total, preferentemente aproximadamente 23 miligramos de histidina/gramo de proteína total.

25 25 En ciertas realizaciones del método, la proporción en peso en el alimento del aminoácido triptófano con respecto a la proteína total es de aproximadamente 12 a 14 miligramos de triptófano/gramo de proteína total, preferentemente de aproximadamente 12 miligramos de triptófano/gramo de proteína total.

30 30 En ciertas realizaciones preferidas, el paciente seleccionado tiene el trastorno metabólico PKU. Los alimentos medicinales de la invención son más apetecibles que las fórmulas de aminoácidos convencionales, ayudan a reducir los niveles dañinos de Phe en plasma y cerebro, y ayudan a mejorar la retención de proteínas en dichos pacientes.

35 35 En algunas realizaciones, el alimento se administra a un ser humano que tiene al menos dos años.

40 Aunque en ciertas realizaciones preferidas, el paciente seleccionado tiene el trastorno metabólico PKU, el método engloba la administración de los alimentos medicinales a pacientes que tienen otros trastornos metabólicos. Otros trastornos metabólicos que podrían tratarse eficazmente mediante la administración de los alimentos de la presente invención incluyen: trastornos del metabolismo de la tirosina (tirosinemia de tipo I, tirosinemia de tipo II, tirosinemia de tipo III/Hawkinsuria, y Alcaptonuria/Ocronosis); trastornos del metabolismo del triptófano (hipertriptofanemia); y trastornos del metabolismo de la histidina (Carnosinemia, Histidinemia y Aciduria urocánica).

45 Los siguientes ejemplos se ofrecen solo a efectos ilustrativos.

### III. EJEMPLOS

#### Ejemplo 1: Dieta de glicocomacropéptido complementado en el modelo murino de PKU

50 50 En este ejemplo, los solicitantes demuestran que, en un modelo murino convencional de PKU, una dieta de glicocomacropéptido complementada apoya el crecimiento y reduce las concentraciones de fenilalanina tanto en plasma como en cerebro, en comparación con una dieta de aminoácidos. El modelo murino de deficiencia de PAH, el ratón *Pah<sup>enu2</sup>* (ratón con PKU) es un modelo adecuado para estudiar el tratamiento nutricional de la PKU, ya que presenta hiperfenilalaninemia y defectos cognitivos similares a los seres humanos con PKU. Además, en paralelo a la dieta baja en Phe humana, en la que la mayoría de la proteína de la dieta es proporcionada por aminoácidos, los estudios en el ratón con PKU usan una dieta a base de aminoácidos a menudo exenta de Phe con suministro de Phe en el agua potable. Nuestro objetivo fue evaluar cómo la ingesta de dietas que contienen GMP como única fuente de proteína ayuda al crecimiento y tiene un impacto en las concentraciones de aminoácidos, en particular, de Phe, en plasma y cerebro de ratones silvestres (WT) y con PKU. Los resultados demostraron un crecimiento adecuado y concentraciones significativamente reducidas de Phe en plasma y cerebro de ratones con PKU alimentados con GMP en comparación con una dieta de aminoácidos.

#### Materiales y métodos

65 65 Ratones. Las instalaciones para animales y los protocolos informados fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Wisconsin-Madison. Se criaron ratones WT machos y hembras

de 4 a 6 semanas de edad que pesaban de 18 a 22 g en el mismo fondo que los ratones con PKU (C57B1/6, Jackson Laboratories). Los ratones con PKU eran homocigotos para la mutación *Pah*, pero fueron criados y retrocruzados en el fondo de C57B1/6 para aumentar las instalaciones de cría. Las parejas reproductoras de ratones con PKU fueron proporcionadas por Cary O. Harding, Oregon Health and Science University, Portland, OR. Se realizó el genotipado para la presencia de la mutación *Pah*<sup>enu</sup><sup>2</sup> mediante el análisis de PCR de ADN de biopsia de la cola en una región amplificada del exón 7. Los ratones se alojaron individualmente en jaulas con fondo de alambre, de acero inoxidable, en una habitación mantenida a 22 °C en un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 h y se les dio acceso libre a agua. Los ratones se pesaron todos los días a las 10:00 y se determinó la ingesta de alimentos diariamente. Al final de cada experimento, los ratones se anestesiaron usando isoflurano a través de una máquina de anestesia (IsoFlo, Abbott Laboratories) y se sacrificaron mediante punción/exsanguinación cardíaca entre las 8:00 y las 10:00 con la retirada de la comida 1 h antes de sacrificarlos.

*Dietas.* Se diseñaron dietas purificadas para proporcionar cantidades similares de vitaminas, minerales, energía y macronutrientes (véase la Tabla 1). La fuente de proteína en las dietas fue proporcionada por caseína, aminoácidos libres, GMP (BioPURE GMP, Davisco Foods) y GMP procesado para reducir el contenido residual de Phe (véase Etzel M. R., *J Nutr.* 2004; 134:S996-1002). Las dietas con GMP fueron complementadas con 1,5 veces las necesidades sugeridas por el NRC (véase "NRC, Nutrient Requirements of the Mouse, in Nutrient Requirements of Laboratory Animals", 4<sup>a</sup> ed. Washington D.C: National Academy Press; 1995) para los siguientes AAI limitantes para compensar la absorción y degradación más rápida de aminoácidos en comparación con la proteína intacta: arginina, histidina, leucina, metionina, triptófano y tirosina. El contenido de nitrógeno de las dietas de aminoácidos y de GMP bajas en Phe fueron similares, 24,1 y 22,9 g de nitrógeno/kg de dieta, respectivamente, y ambas dietas proporcionaron 175 g de aminoácidos/kg de dieta. El análisis completo de aminoácidos de las dietas se realizó en Experiment Station Chemical Laboratories, Universidad de Missouri-Columbia (Columbia, MO) (véase la Tabla 2).

25

Tabla 1: Dietas experimentales

Ingrediente	Caseína	GMP adecuado	GMP, deficiente en Phe	GMP, bajo en Phe	Aminoácido, bajo en Phe
g/kg					
Proteína					
Caseína	200,0				
GMP BioPure <sup>1</sup>		200,0		200,0	
GMP Wisconsin <sup>2</sup>			200,0		
HCl de L-arginina		4,6	4,6	4,6	12,1 <sup>3</sup>
L-Cistina	3,0				3,5
L-Histidina, HCl•H <sub>2</sub> O		3,2	3,2	3,2	4,5
L-Leucina		6,8	7,0	6,8	11,1
L-Metionina		7,0	7,0	7,0	8,2
L-Fenilalanina		10,4		0,15	0-2,5
L-Tirosina		5,0	5,0	5,0	5,0
L-Triptófano		1,3	1,5	1,3	1,8
Hidrato de carbono					
Sacarosa	180,0	180,0	180,0	180,0	359,0
Almidón de maíz	302,0	279,0	287,0	288,0	150,0
Maltodextrina	130,0	130,0	130,0	130,0	150,0
Celulosa	50,0	50,0	50,0	50,0	30,0
Grasa					
Aceite de soja	70,0	70,0	70,0	70,0	80,0
Bitartrato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Vitaminas y minerales					
Mezcla de vitaminas AIN-93-VX <sup>4</sup>	10,0	10,0	10,0	10,0	13,0
Mezcla de minerales AIN-93G-MX <sup>4</sup>	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
Cloruro de sodio	8,0				
Fosfato sódico dibásico	5,0				
Fosfato de cálcico monobásico		5,0	5,0	5,0	8,0
Carbonato de calcio	3,8		1,6		
Óxido de magnesio	0,3		0,3		
Antioxidante					
<i>t</i> -Butilhidroquinona	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02

Ingrediente	Caseína	GMP adecuado	GMP, deficiente en Phe	GMP, bajo en Phe	Aminoácido, bajo en Phe
<sup>1</sup> GMP BioPURE; Davisco Foods International, Inc., LeSueur, MN.					
<sup>2</sup> GMP comercial procesado para reducir el contenido de Phe.					
<sup>3</sup> Además, se incluyeron los siguientes L-aminoácidos para un total de 175 g de aminoácidos/kg de dieta: alanina, 3,5; asparagina, 6,0; ácido aspártico, 3,5; ácido glutámico, 40; glicina, 23,3; isoleucina, 8,2;					
<sup>4</sup> HCl de lisina, 18,0; prolina, 3,5; serina, 3,5; treonina, 8,2; y valina, 8.					
<sup>4</sup> Según lo informado por Reeves <i>et al</i> , "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet". <i>J Nutr.</i> 1993; 123:1939-51.					

Tabla 2: Perfil de aminoácidos de las dietas

Aminoácido	Caseína	GMP adecuado	GMP, deficiente en Phe	GMP, baja en Phe	Aminoácido, baja en Phe
Alanina	5,4	8,4	8,4	8,8	3,5
Arginina	6,8	1,2	3,8	3,7	8,4
Ácido aspártico	12,6	13,0	12,9	14,3	9,7
Cisteína	3,4	0,2	0,2	0,2	3,5
Ácido glutámico	41,2	32,3	31,9	33,5	40,0
Glicina	3,4	1,8	1,7	2,1	23,3
Histidina	5,7	2,6	2,9	2,9	2,6
Isoleucina	9,3	16,0	15,5	15,1	9,0
Leucina	17,2	10,0	10,7	12,0	13,9
Lisina	15,1	8,8	8,7	8,1	17,0
Metionina	4,8	8,3	7,9	8,3	8,2
Fenilalanina	9,4	10,1	0,4	2,2	2,4
Prolina	19,3	18,3	18,1	18,5	5,3
Serina	8,0	8,9	9,2	10,4	2,8
Treonina	7,2	32,9	23,5	27,5	8,2
Triptófano	2,3	1,4	1,5	1,5	1,8
Tirosina	8,6	4,2	4,0	4,9	4,1
Valina	12,0	12,5	12,3	14,1	9,4

**Diseño experimental.** Se realizaron tres experimentos. El Expt. 1 ensayó la idoneidad del GMP complementado con AAI para apoyar la ingesta de alimentos y el crecimiento en ratones WT macho de 4 semanas de vida alimentados durante 42 días. Se incluyeron tres grupos de tratamiento dietético ( $n = 10/\text{grupo}$ ): control de caseína, GMP complementado con todos los AAI limitantes (GMP adecuado) y, para establecer que la Phe era limitante, GMP procesado para reducir la Phe residual y complementado con todos los AAI limitantes a excepción de Phe (GMP deficiente en Phe). Cuando la ingesta de alimento falló tras 3 días de alimentación con la dieta de GMP deficiente en Phe, se añadió Phe al agua potable (1 g de Phe/l) en d 4.

El Expt. 2 ensayó la capacidad de las dietas que contenían aminoácidos y GMP para apoyar el crecimiento en ratones con PKU machos y hembras (5-8 semanas de vida) cuando se proporcionó Phe en el agua potable (1 g de Phe/l) durante 21 d. Se incluyeron tres grupos de tratamiento dietético ( $n = 10/\text{grupo}$ ): ratones con PKU alimentados con la dieta de GMP deficiente en Phe, ratones con PKU alimentados con una dieta deficiente en el aminoácido Phe y ratones WT alimentados con la dieta de GMP adecuado. Se midió la ingesta de agua potable diariamente en ratones con PKU y se ajustó por evaporación para determinar la cantidad de Phe consumida.

El Expt. 3 evaluó la capacidad de las dietas que contenían aminoácidos y GMP que se complementaron con una cantidad mínima de Phe (determinada a partir del Expt. 2) para favorecer el crecimiento y afectar a las concentraciones de aminoácidos en plasma y cerebro de ratones con PKU machos y hembras alimentados durante 47 d. Se incluyeron cuatro grupos de tratamiento dietético: ratones WT de 6 semanas de vida alimentados con caseína ( $n = 8$ ) o la dieta con GMP adecuado ( $n = 7$ ) y ratones con PKU de 8 a 10 semanas de vida alimentados con el aminoácido, baja en Phe ( $n = 10$ ) o la dieta de GMP, baja en Phe ( $n = 11$ ). Hubo números similares de ratones machos y hembras en cada grupo de tratamiento. Se obtuvieron muestras de sangre mediante sangrado orbital para el análisis de aminoácidos usando tubos capilares heparinizados después de 21 días de alimentación ( $n = 5/\text{grupo}$ ). Los ratones se anestesiaron, se sacrificaron por exsanguinación cardiaca y se decapitaron después de 47 d. Se extirparon rápidamente los cerebros y se colocaron en una placa de vidrio enfriada con hielo seco. Usando hitos visuales, se tomaron muestras de las 5 siguientes regiones: cerebelo, tallo cerebral, hipotálamo, corteza parietal y corteza piriforme anterior. Las muestras se colocaron en tubos de poliestireno previamente pesados, se pesaron para determinar la masa de muestra y se almacenaron a -80 °C hasta el procesamiento.

**Análisis de aminoácidos.** Se recogió sangre mediante punción cardíaca en jeringas que contenían una concentración

final de 2,7 mmol/l de EDTA y se aisló el plasma por centrifugación a 1700 x g; 15 min a 4 °C. Se determinó el perfil de aminoácidos libres en plasma usando un analizador de aminoácidos Beckmann 6300 dotado de un sistema de cromatografía iónica usando derivatización de nihidrina posterior a la columna. Las muestras se desproteinizaron con ácido sulfosalicílico, se centrifugaron (14.000 x g, 5 min, y se pasaron a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm antes de añadir un patrón interno e inyectarlo en la columna.

Se determinó el perfil de aminoácidos libres en el cerebro en el Laboratorio de análisis de aminoácidos, Universidad de California-Davis, Escuela de Medicina Veterinaria (Davis, CA) usando un analizador de aminoácidos Biochrom 30 (Biochrom). El procedimiento para la extracción de aminoácidos de las muestras cerebrales incluyó la adición de ácido sulfosalicílico al 3 % que contenía 100 µmol/l de Norleucina como patrón interno (Sigma Chemicals) en una proporción de 1:10 (p/v), la homogenización con una aguja ultrasónica durante 2 minutos, la centrifugación a 14,000 x g; 20 min a 4 °C y la filtración del sobrenadante a través de un filtro impulsor de jeringa de 0,45 µm. Se ajustó el filtrado a pH 2,2 con 0,4 mol/l de LiOH y se inyectaron 0,05 ml en la columna. Los valores se expresan en nmol de aminoácido/g de peso del tejido húmedo.

**Estadística.** Los análisis estadísticos se realizaron usando SAS versión 8.2 (SAS Institute) y R (Universitat Wien, Viena, Austria). Los datos se analizaron usando modelos lineales generales. Las diferencias entre los grupos de tratamiento dietético se determinaron mediante la técnica de diferencia mínima significativa protegida. Las estadísticas se realizaron en datos transformados logarítmicamente cuando los gráficos residuales indicaron una varianza desigual entre los grupos como ocurrió para algunos de los datos. Cuando fue apropiado, se incluyó el sexo como covariable para ajustar su posible influencia. Los cambios en el peso corporal (PC) entre los grupos de tratamiento se evaluaron con análisis de medidas repetidas en el Expt. 1. Entre los ratones con PKU, se usó la regresión lineal simple para examinar las correlaciones entre la ingesta de la dieta de aminoácidos 48 h antes de la muerte y las concentraciones de aminoácidos en plasma y cerebro. Todos los valores se presentan como las medias ± ET;  $p \leq 0,05$  se consideró significativo.

## Resultados

Expt. 1. El peso corporal inicial y final no difirieron entre los 3 grupos de tratamiento dietético (véase la Fig. 1). La ingesta de alimentos y el PC no difirieron al comparar los grupos adecuados de caseína y GMP a lo largo del estudio de 42 días. Los ratones dejaron de tomar la dieta de GMP deficiente en Phe después de 3 días, momento en el que se añadió Phe al agua potable y se reanudó la ingesta de alimento. Los 3 grupos de dieta no difirieron en los cambios en el peso corporal diario del d 14 al d 42.

El perfil de aminoácidos en plasma fue significativamente alterado con la ingesta de GMP en comparación con la caseína. Los ratones WT alimentados con las dietas de GMP adecuado o deficientes en Phe mostraron concentraciones en plasma elevadas de AAI, treonina, isoleucina y metionina, que fueron 3 veces, 2,4 veces y 1,6 veces, respectivamente, de las concentraciones en ratones alimentados con la dieta de caseína (datos no mostrados). Los ratones alimentados con la dieta de GMP deficiente en Phe mostraron concentraciones en plasma de Phe y tirosina significativamente más bajas en comparación con los grupos de caseína y GMP adecuado.

Expt. 2. El peso corporal inicial ( $16\text{--}18 \pm 1,4$  g) y final ( $19\text{--}21 \pm 1,3$  g) y la ingesta de alimentos (de  $3,3$  a  $4,1 \pm 0,3$  g/d) no difirió significativamente entre los 3 grupos de tratamiento durante 21 d. La ingesta media de Phe en los ratones con PKU fue de  $6,5 \pm 0,5$  mg de Phe/d con la ingesta de la dieta de aminoácidos deficiente en Phe y de  $5,9 \pm 0,3$  mg de Phe/d con la ingesta de la dieta de GMP deficiente en Phe ( $p > 0,10$ ). Teniendo en cuenta las presentes observaciones del Expt. 1 y 2 de que el crecimiento puede estar limitado con el suministro de Phe en el agua potable, se decidió complementar las dietas de GMP y de aminoácidos deficiente en Phe para que el Expt. 3 contuviera 2,5 g de Phe/kg de dieta. Esto proporcionó una ingesta de Phe diaria para ratones con PKU en crecimiento de 7,5 a 10 mg de Phe.

Expt. 3. Ganancia de peso corporal, utilización de alimento basado en la relación entre la ingesta de alimento y la ganancia de PC, y la relación de la eficiencia proteica no difirió entre los 4 grupos de tratamiento dietético (véase Tabla 3). Los ratones con PKU fueron ~2 g más pesados que los ratones WT ( $p < 0,05$ ), en consonancia con que los primeros tenían 2 semanas más. Los ratones hembra de ambos genotipos pesaron menos que los ratones macho al final del estudio ( $20 \pm 1$  g frente a  $25 \pm 1$  g,  $n = 17\text{--}18$ ,  $p < 0,0001$ ).

Tabla 3: PC, utilización de la alimentación y masa de órganos de ratones WT y con PKU alimentados con dietas que contienen caseína, GMP o aminoácidos (Exp. 3)<sup>1</sup>

	Ratones WT		Ratones con PKU	
	Caseína	GMP adecuado	Aminoácido, baja en Phe	GMP, baja en Phe
<i>n</i>	8	7	10	11
PC				
Inicial, g	$16,9 \pm 0,8^{\text{bc}}$	$16,3 \pm 1,2^{\text{c}}$	$19,3 \pm 1,0^{\text{a}}$	$18,6 \pm 0,9^{\text{ab}}$
Final, g	$21,2 \pm 1,1^{\text{b}}$	$21,2 \pm 0,9^{\text{b}}$	$23,8 \pm 1,3^{\text{a}}$	$23,3 \pm 0,8^{\text{a}}$

	Ratones WT		Ratones con PKU	
	Caseína	GMP adecuado	Aminoácido, baja en Phe	GMP, baja en Phe
Ganancia, g/47 d	4,3 ± 0,6	5,0 ± 0,7	4,5 ± 0,8	4,7 ± 0,7
Utiliz. de la alim.				
Ingesta de alimento, g	147 ± 5 <sup>b</sup>	145 ± 4 <sup>b</sup>	169 ± 8 <sup>a</sup>	166 ± 4 <sup>a</sup>
Relación alim:ganancia	39 ± 6	32 ± 3	45 ± 6	40 ± 6
Relación de eficiencia proteica <sup>2</sup>	0,17 ± 0,02	0,20 ± 0,08	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,03
Masa relativa de órganos, g/100 g de PC				
Riñón	1,38 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,28 ± 0,02 <sup>bc</sup>	1,48 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,26 ± 0,02 <sup>c</sup>
Corazón	0,51 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,60 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,52 ± 0,01 <sup>b</sup>
Hígado	4,61 ± 0,20 <sup>b</sup>	4,77 ± 0,13 <sup>b</sup>	5,22 ± 0,09 <sup>a</sup>	5,31 ± 0,11 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Los valores son las medias ± ET. Las medias de una columna con superíndices sin una letra en común difieren,  $p < 0,05$ .

<sup>2</sup> Relación de eficiencia proteica, g de ganancia en el PC/g de ingesta de proteína.

La masa relativa de órganos mostró diferencias significativas debido a la dieta y el sexo. La masa renal fue significativamente mayor en los ratones con PKU alimentados con la dieta de aminoácidos en comparación con los otros grupos. La masa cardíaca fue significativamente mayor en los ratones WT alimentados con la dieta de GMP adecuado en comparación con los otros grupos. Los ratones con PKU alimentados con la dieta de aminoácidos o GMP mostraron una masa relativa de hígado significativamente mayor en comparación con los ratones WT. Los ratones hembra de ambos genotipos mostraron una masa renal relativa significativamente menor y una masa cardíaca relativa significativamente mayor en comparación con los ratones macho.

- 5 10 El perfil de aminoácidos en plasma se vio afectado por la dieta y el sexo (véase la Tabla 4).

Tabla 4: Concentraciones de aminoácidos en plasma de ratones WT y con PKU alimentados con dietas que contienen caseína, GMP o aminoácidos (Exp. 3)<sup>1</sup>

	Ratones WT		Ratones con PKU	
	Caseína	GMP adecuado	Aminoácido baja en Phe	GMP baja en Phe
			μmol//	
Alanina	793 ± 97	570 ± 108	698 ± 63	580 ± 75
Arginina	86 ± 7 <sup>a</sup>	61 ± 5 <sup>b</sup>	81 ± 7 <sup>a</sup>	62 ± 5 <sup>b</sup>
Aspartato	30 ± 2	25 ± 3	23 ± 2	24 ± 2
Citrulina	46 ± 4	41 ± 3	57 ± 6	53 ± 6
Cistina	8 ± 2	8 ± 2	11 ± 3	8 ± 3
Glutamato	47 ± 4	44 ± 4	36 ± 4	41 ± 3
Glutamina	565 ± 41 <sup>ab</sup>	613 ± 35 <sup>a</sup>	430 ± 17 <sup>c</sup>	505 ± 25 <sup>bc</sup>
Glicina	248 ± 15 <sup>b</sup>	227 ± 21 <sup>b</sup>	654 ± 43 <sup>a</sup>	182 9b
Histidina	91 ± 8 <sup>a</sup>	65 ± 4 <sup>b</sup>	71 ± 4 <sup>b</sup>	62 ± 4 <sup>b</sup>
Isoleucina	95 ± 8 <sup>b</sup>	155 ± 31 <sup>a</sup>	78 ± 5 <sup>b</sup>	155 ± 15 <sup>a</sup>
Leucina	190 ± 11 <sup>a</sup>	123 ± 13 <sup>b</sup>	108 ± B <sup>b</sup>	130 ± 8 <sup>b</sup>
Lisina	501 ± 49 <sup>a</sup>	277 ± 12 <sup>c</sup>	397 ± 37 <sup>b</sup>	269 ± 16 <sup>c</sup>
Metionina	96 ± 9	85 ± 13	80 ± 9	70 ± 9
Ornิตina	63 ± 6 <sup>a</sup>	35 ± 2 <sup>c</sup>	47 ± 4 <sup>b</sup>	40 ± 3 <sup>bc</sup>
Fenilalanina	59 ± 3 <sup>c</sup>	45 ± 3 <sup>c</sup>	851 ± 29 <sup>a</sup>	756 ± 21 <sup>b</sup>
Prolina	209 ± 35 <sup>a</sup>	228 ± 83 <sup>a</sup>	74 ± 6 <sup>b</sup>	97 ± 11 <sup>b</sup>
Serina	248 ± 24 <sup>ab</sup>	207 ± 23 <sup>bc</sup>	265 ± 14 <sup>a</sup>	173 ± 10 <sup>c</sup>
Taurina	643 ± 22	600 ± 67	624 ± 63	532 ± 45
Treonina	303 ± 32 <sup>b</sup>	562 ± 76 <sup>b</sup>	331 ± 19 <sup>b</sup>	557 ± 65 <sup>a</sup>
Triptófano	110 6 7 <sup>a</sup>	106 ± 16 <sup>ab</sup>	87 ± 10 <sup>c</sup>	93 ± 5 <sup>bc</sup>
Tirosina	121 ± 12 <sup>a</sup>	82 ± 7 <sup>b</sup>	31 ± 3 <sup>c</sup>	25 ± 2 <sup>c</sup>
Valina	293 ± 31 <sup>a</sup>	228 ± 30 <sup>bc</sup>	184 ± 16 <sup>c</sup>	262 ± 22 <sup>ab</sup>
BCAA <sup>2</sup>	609 ± 49 <sup>a</sup>	505 ± 66 <sup>a</sup>	370 ± 16 <sup>b</sup>	548 ± 41 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Los valores son las medias ± ET,  $n = 8$ . Las medias de una columna con superíndices sin una letra en común difieren,  $p < 0,05$ .

<sup>2</sup> BCAA, Suma de isoleucina, leucina y valina.

Los ratones con PKU alimentados con dieta de aminoácidos o de GMP baja en Phe mostraron concentraciones en plasma de Phe 15 veces superiores y una disminución del 60-70 % en las concentraciones en plasma de tirosina y prolina en comparación con los ratones WT alimentados con dietas de caseína o de GMP. Ambos ratones WT y con PKU alimentados con dietas de GMP mostraron concentraciones en plasma de treonina e isoleucina que eran ~2

- 5 veces los valores en ratones WT y PKU alimentados con las dietas de caseína o de aminoácidos ( $p < 0,002$ ). Se observaron concentraciones en plasma reducidas de lisina en ratones WT y PKU alimentados con dietas de GMP ( $272 \pm 11 \mu\text{mol/l}$ ) en comparación con ratones WT y PKU alimentados con las dietas de caseína o de aminoácidos ( $443 \pm 31 \mu\text{mol/l}$ ;  $p < 0,0001$ ;  $n = 17-18$ ). Ratones hembra de ambos genotipos mostraron mayores concentraciones 10 en plasma de tirosina ( $74 \pm 6$  frente a  $53 \pm 8 \mu\text{mol/l}$ ) y triptófano ( $113 \pm 5$  frente a  $81 \pm 5 \mu\text{mol/l}$ ) en comparación con ratones macho ( $p < 0,01$ ;  $n = 17-18$ ).

Los ratones con PKU alimentados con GMP en comparación con la dieta de aminoácidos tuvieron diferencias significativas en las concentraciones de aminoácidos en plasma. Los ratones con PKU tuvieron una significativa reducción del 11 % en la concentración de Phe en plasma con la ingesta de GMP en comparación con la dieta de 15 aminoácidos durante 47 d; este efecto no se observó el día 21. La ingesta de Phe durante las últimas 48 h antes de que los ratones fueran sacrificados fue similar para los ratones con PKU (16-18 mg de Phe/48 h), pero fue significativamente inferior en comparación con los ratones WT (58-66 mg de Phe/48 h). La suma de las concentraciones en plasma de los aminoácidos de cadena ramificada, isoleucina, leucina y valina, aumentó en un 20 50 % en ratones con PKU alimentados con GMP en comparación con la dieta de aminoácidos; sin embargo, la concentración de leucina no difirió. Entre los ratones con PKU, se correlacionaron la ingesta de aminoácidos con la dieta durante las últimas 48 h antes de que los ratones fueran sacrificados y las concentraciones de aminoácidos en plasma. Las correlaciones positivas más altas ( $p < 0,0001$ ;  $n = 15$ ) incluyen las siguientes: glicina,  $R^2 = 0,88$ ; treonina,  $R^2 = 0,45$ ; isoleucina,  $R^2 = 0,44$ ; y valina,  $R^2 = 0,34$ .

- 25 El perfil de aminoácidos en el cerebelo difirió significativamente debido a la dieta, pero no al sexo (véase la Tabla 5). La concentración de Phe en el cerebelo de los ratones con PKU fue de 3 a 4 veces el valor en los ratones WT ( $p < 0,0001$ ). Las concentraciones de tirosina y la suma de los aminoácidos de cadena ramificada en el cerebelo de los 30 ratones con PKU fueron ~50 % de las de los ratones WT independientemente de la dieta ( $p < 0,0001$ ). Los ratones con PKU alimentados con la dieta de GMP tuvieron una reducción del 20 % en la concentración de Phe en el cerebelo en comparación con los ratones con PKU alimentados con la dieta de aminoácidos.

Además, esta respuesta de una reducción del 20 % en la concentración de Phe se observó en cada uno de los 5 cortes cerebrales muestreados: cerebelo, tallo cerebral, hipotálamo, corteza parietal y corteza piriforme anterior (Fig. 2). Las concentraciones de treonina e isoleucina en el cerebelo aumentaron un 70-100 % en los ratones con PKU alimentados con la dieta de GMP en comparación con la dieta de aminoácidos ( $p < 0,0001$ ). Se observó una tendencia similar para la concentración de valina superior en el cerebelo de los ratones con PKU alimentados con la dieta de GMP en comparación con la dieta de aminoácidos ( $p < 0,10$ ). La concentración de Phe en el cerebelo de los ratones con PKU fue inversamente proporcional a las concentraciones de treonina, isoleucina y valina en plasma, así como la suma de las concentraciones de treonina, isoleucina y valina en plasma,  $R^2 = 0,65-0,77$  ( $p < 0,0001$ ) 40 (Fig. 3). La concentración de glutamina en el cerebelo fue un 11 % inferior en los ratones con PKU en comparación con los ratones WT independientemente de la dieta ( $p < 0,05$ ). Las concentraciones en el cerebelo de triptófano, el precursor de la serotonina neurotransmisora, y la glicina, un precursor del sistema neurotransmisor glicinérgico del cerebro, no difirió entre los grupos.

Tabla 5: Concentraciones de aminoácidos en el cerebelo de ratones WT y ratones con PKU alimentados con dietas que contienen caseína, GMP o aminoácidos (Expt. 3)<sup>1</sup>

Aminoácido	Ratones WT		Ratones con PKU	
	Caseína	GMP adecuado	Aminoácido bajo en Phe	GMP bajo en Phe
	nmol/g			
Alanina	2380 ± 193	2145 ± 134	2082 ± 27	2303 ± 83
Arginina	55 ± 8	50 ± 6	35 ± 3	40 ± 5
Aspartato	9060 ± 306	9122 ± 256	8406 ± 191	8836 ± 630
Citrulina	373 ± 39	320 ± 42	293 ± 29	277 ± 25
Media cistina	110 ± 22	99 ± 15	93 ± 21	149 ± 39
Glutamato	12,870 ± 837	13,264 ± 712	12,886 ± 367	13,254 ± 505
Glutamina	11,459 ± 88 <sup>a</sup>	11,209 ± 197 <sup>a</sup>	10,049 ± 359 <sup>b</sup>	10,099 ± 250 <sup>b</sup>
Glicina	3923 ± 316	3764 ± 228	4383 ± 334	3753 ± 291
Histidina	216 ± 17	186 ± 12	236 ± 9	200 ± 8
Isoleucina	197 ± 19 <sup>a</sup>	192 ± 24 <sup>a</sup>	61 ± 21 <sup>c</sup>	123 ± 21 <sup>b</sup>
Leucina	462 ± 66 <sup>a</sup>	366 ± 43 <sup>a</sup>	164 ± 30 <sup>b</sup>	185 ± 30 <sup>b</sup>
Lisina	683 ± 35 <sup>a</sup>	581 ± 38 <sup>b</sup>	678 ± 31 <sup>a</sup>	615 ± 10 <sup>ab</sup>
Metionina	309 ± 18	286 ± 24	214 ± 14	163 ± 24
Ornitina	5 ± 1	5 ± 2	3 ± 2	7 ± 4
Fenilalanina	271 ± 34 <sup>c</sup>	232 ± 22 <sup>c</sup>	1030 ± 25 <sup>a</sup>	820 ± 49 <sup>b</sup>
Prolina	312 ± 29	255 ± 35	187 ± 15	218 ± 24
Serina	1856 ± 91 <sup>b</sup>	1780 ± 87 <sup>bc</sup>	2156 ± 44 <sup>a</sup>	1609 ± 78 <sup>c</sup>
Taurina	10,886 ± 58	11,109 ± 292	10,896 ± 108	10,603 ± 96
Treonina	1300 ± 49 <sup>c</sup>	2590 ± 87 <sup>a</sup>	1589 ± 46 <sup>b</sup>	2695 ± 82 <sup>a</sup>
Triptófano	90 ± 26	86 ± 12	59 ± 2	73 ± 3
Tirosina	341 ± 27 <sup>a</sup>	278 ± 25 <sup>b</sup>	128 ± 14 <sup>c</sup>	128 ± 12 <sup>c</sup>
Valina	337 ± 40 <sup>a</sup>	304 ± 27 <sup>ab</sup>	187 ± 11 <sup>c</sup>	246 ± 20 <sup>bc</sup>
BCAA <sup>2</sup>	966 ± 127 <sup>a</sup>	862 ± 92 <sup>a</sup>	413 ± 55 <sup>b</sup>	553 ± 39 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Los valores son las medias ± ET, n = 8. Para los ratones con PKU, el tamaño de muestra fue de 3 para los siguientes aminoácidos: alanina, aspartato, citrulina, glutamina, prolina, taurina y triptófano. Las medias de una columna con superíndices sin una letra en común difieren, p < 0,05.

<sup>2</sup> BCAA, suma de isoleucina, leucina y valina.

## Discusión

Este estudio evalúa la capacidad de las dietas que contienen GMP complementadas con AAI como la única fuente de proteína para apoyar el crecimiento y afectar a las concentraciones de aminoácidos en el plasma y cerebro de los ratones con PKU. En apoyo de la utilización de GMP como fuente de proteína baja en Phe en la dieta para la PKU, se observó un crecimiento similar con concentraciones significativamente inferiores de Phe en el plasma y cerebros de ratones con PKU alimentados con GMP en comparación con una dieta de aminoácidos.

Cuando se alimenta como la única fuente de proteínas de la dieta, el GMP contiene cantidades limitantes de varios AAI para el crecimiento de ratones que incluyen: arginina, histidina, leucina, metionina, Phe, triptófano y tirosina. Los presentes resultados mostraron un crecimiento adecuado de los ratones que se alimentaron con GMP complementado con estos AAI limitantes. En el Expt. 1, los ratones WT destetados alimentados con caseína o la dieta de GMP adecuado tuvieron un crecimiento prácticamente idéntico durante 6 semanas. En el Expt. 3, los ratones con PKU alimentados con dietas de GMP o de aminoácidos con una ingesta similar de Phe mostraron ganancias del PC, eficiencia de la alimentación y una relación de eficiencia proteica que no fueron significativamente diferentes. Estos datos demuestran que el GMP complementado con AAI limitante proporciona una fuente nutricionalmente adecuada de proteína de la dieta para ratones en crecimiento.

El consumo de una dieta que es deficiente en un AAI deprime rápidamente la concentración del AAI limitante en plasma y cerebro con una ingesta de alimentos reducida en ratas (Harper, et al., *Physiol Rev.* 1970; 50:428-39). Por lo tanto, no fue sorprendente que, en el Expt. 1, los ratones dejaran de comer la dieta de GMP deficiente en Phe y perdieran peso corporal tras solo 3 días con esta dieta, y esa adición de Phe al agua potable normalizó la ingesta de comida y aumentó el PC. Las concentraciones en plasma de isoleucina y treonina en ratones WT alimentados con la dieta de GMP adecuado fueron de 2 a 3 veces mayores que en los ratones WT alimentados con la dieta de caseína. Sin embargo, estas alteraciones en las concentraciones en plasma de aminoácidos no afectaron a la ingesta de comida en los ratones alimentados con GMP una vez que se corrigió la deficiencia de Phe. Por lo tanto, se concluye que la ingesta de GMP complementado con todos los AAI limitantes altera el perfil de aminoácidos en plasma sin reducir la ingesta de alimentos en ratones en crecimiento.

En contraste con otros AAI, la captación hepática de la treonina es baja y la oxidación de la treonina a CO<sub>2</sub> a través de la actividad de la treonina deshidratasa hepática (CE 4.2.1.16) es limitada en los seres humanos (Darling et al., *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;278:E877-84) y ratas (Harper, et al., *Physiol Rev.* 1970;50:428-39). Por lo tanto, un aumento en la treonina en la dieta sin un aumento en la ingesta de proteína total produce la expansión del

grupo de treonina en plasma sin toxicidad si las dietas proporcionan < 15 veces el nivel normal de treonina. La concentración de treonina en plasma mostró el mayor aumento con la ingesta de GMP en comparación con la dieta de caseína y aminoácidos en los 3 experimentos.

- 5 La degradación de treonina a glicina a través de treonina deshidrogenasa (EC 1.1.1.103) es una vía catabólica principal en ratas pero no en seres humanos (Darling, et al., *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 278:E877-84). Los niveles elevados de glicina son potencialmente neurotóxicos en el cerebro debido al sistema neurotransmisor glicinérgico que puede inhibir o estimular la transmisión de impulsos nerviosos (Spencer et al., *J Neurosci.* 1989; 9:2718-36). Sin embargo, la presente demostración de que no hay aumento en la concentración de glicina en 10 plasma y cerebro sugiere que la alimentación con una dieta de GMP que proporciona 3 veces la ingesta normal de treonina no es suficiente para modificar la concentración de glicina en el cerebro. Tomados en conjunto, estos hallazgos respaldan la seguridad del GMP en la dieta.
- 15 Además, la disminución del 11 % en la concentración de Phe en plasma de los ratones con PKU alimentados con GMP en comparación con la dieta de aminoácidos durante 47 d es un hallazgo positivo para el tratamiento nutricional de la PKU. El hallazgo de mayor relevancia para el tratamiento de la PKU y los efectos neurotóxicos conocidos de la Phe es la observación de los presentes inventores de que los ratones con PKU alimentados con GMP en comparación con la dieta de aminoácidos tuvieron una disminución del 20 % en las concentraciones de Phe 20 en 5 cortes cerebrales. La concentración de Phe en el cerebro es la mejor correlación de la deficiencia mental en individuos con PKU (Donlon et al., "Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease", en Scriver et al., editores, 8<sup>a</sup> ed. Capítulo 77, Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine Hydroxylase Deficiency, Nueva York: McGraw-Hill; 2007). La explicación más probable para la concentración reducida de Phe en el cerebro de ratones con PKU alimentados con GMP es que los niveles en plasma elevados de AANG debido a la ingesta de GMP inhiben competitivamente el 25 transporte de Phe a través de la barrera hematoencefálica a través de la proteína transportadora AANG, que tiene una Km significativamente inferior en el cerebro en comparación con el intestino. Esta conclusión está respaldada por una correlación inversa significativa entre las concentraciones en plasma superiores de treonina, isoleucina y valina y una menor concentración de Phe en el cerebro. Curiosamente, investigaciones previas demuestran que la isoleucina, pero no la treonina, inhibe competitivamente el transporte de la Phe en cerebro de rata (Tovar et al., *J Neurochem.* 1988;51: 1285-93).
- 30 En resumen, se demuestra que los ratones con PKU alimentados con una dieta con GMP al 20 % complementado con AAI en comparación con una dieta de aminoácidos muestran un crecimiento similar y menores concentraciones de Phe en el plasma y el cerebro. Estos datos establecen que el GMP puede formularse en una proteína completa nutricionalmente adecuada para ratones en crecimiento, y sugieren que los estudios de alimentación a largo plazo 35 pueden proporcionar una mayor comprensión del metabolismo del GMP. Los hallazgos de los presentes inventores apoyan la investigación continua para establecer la eficacia de los alimentos y de las bebidas elaborados con GMP en el tratamiento nutricional de la PKU en seres humanos.

#### Ejemplo 2: Palatabilidad de los alimentos elaborados con GMP y AA complementarios

- 40 En el presente ejemplo, los solicitantes hicieron una variedad de alimentos y bebidas de sabor agradable bajos en Phe con GMP y evaluaron su aceptabilidad por la realización de estudios sensoriales de los consumidores en los individuos con PKU. Los resultados demuestran la aceptabilidad de los productos elaborados con GMP.

#### 45 Materiales y métodos

- Alimentos y bebidas.** Para el presente estudio, se desarrollaron en el Laboratorio de Aplicaciones de Alimentos del Centro de investigación de lácteos (CDR) de Wisconsin de la Universidad de Wisconsin-Madison (UW), un pudín de fresa, piel de fresa, bebida de chocolate, galletas saladas y una bebida deportiva de naranja que contenían GMP. Se 50 usó BioPURE-GMP (Davisco Foods International, Inc., LeSueur, MN) para formular los productos de GMP. El perfil de aminoácidos de BioPURE-GMP comparado con la caseína se muestra en la Fig. 4.

- Se incluyeron una bebida de chocolate a base de aminoácidos y una galleta salada baja en proteínas comerciales en el ensayo de sabor para proporcionar comparaciones entre los productos de GMP y los productos que se usan actualmente en la dieta para la PKU. La concentración de nitrógeno de las bebidas de GMP y de aminoácidos fue similar. En la Tabla 6, se proporciona el contenido energético y proteico de todos los alimentos ensayados.

Tabla 6: Calificaciones de aceptabilidad medias de alimentos y bebidas elaboradas con GMP según lo ensayado en individuos con PKU

Producto	n. <sup>o</sup> de sujetos	Aspecto	Olor	Sabor	Textura	Global
A. Calificaciones de aceptabilidad para el pudín, la piel de fruta y la bebida deportiva de GMP						
Pudín de fresa de GMP	31	4,0 ± 0,7	3,6 ± 1,1	4,2 ± 1,0	4,1 ± 0,8	4,2 ± 0,9
Piel de fresa de GMP	31	3,4 ± 0,8	3,8 ± 0,9	3,4 ± 1,1	3,0 ± 0,9	3,4 ± 1,0

Producto	n.º de sujetos	Aspecto	Olor	Sabor	Textura	Global
Bebidas deportivas de naranja de GMP	18	4,1 ± 0,6	36 ± 0,9	2,9 ± 1,2	3,8 ± 1,0	3,3 ± 1,1
<b>B. Calificaciones de aceptabilidad para bebida de chocolate a base de GMP y de aminoácidos</b>						
Bebida de chocolate de GMP	32	3,8 ± 0,8 <sup>a</sup>	3,7 ± 1,0 <sup>a</sup>	3,2 ± 1,1 <sup>a</sup>	3,3 ± 1,0	3,3 ± 1,0 <sup>a</sup>
Bebida de chocolate de aminoácidos	32	3,1 ± 1,1 <sup>b</sup>	2,8 ± 1,3 <sup>b</sup>	2,2 ± 1,3 <sup>b</sup>	3,1 ± 1,1	2,5 ± 1,4 <sup>b</sup>
<b>C. Calificaciones de aceptabilidad para galletas saladas de GMP y baja en proteínas</b>						
Galletas saladas de GMP	18	3,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	3,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	3,7 ± 0,8 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,9	3,6 ± 1,4
Galletas saladas bajas en proteínas	18	3,2 ± 0,9 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,8 <sup>b</sup>	2,9 ± 1,1 <sup>b</sup>	3,2 ± 1,2	2,9 ± 1,3
El contenido energético y proteico de los alimentos ensayados es el siguiente: pudín de fresa de GMP, 213 kcal y 5,7 g de proteína por una ración de 1/2 taza (113 g); piel de fruta de GMP, 60 kcal y 0,7 g de proteína por 15 g; bebida deportiva de naranja de GMP, 67 kcal y 7,9 g de proteína por 234 g (8 oz); bebida de chocolate de GMP, 148 kcal y 10,2 g de proteína por 236 g (8 oz); bebida de chocolate de aminoácidos, 187 kcal y 11,4 g de proteína por 202 g (8 oz); galletas saladas de GMP, 110 kcal y 1,3 g de proteína por 30 g; galletas saladas bajas en proteína, 135 kcal y 0,1 g de proteína por 30 g. Medias ± desviación típica (referencia de las puntuaciones: 1, no me gusta nada; 2, no me gusta; 3, ni me gusta ni me disgusta; 4, me gusta; 5, me gusta mucho). Las medias con diferentes superíndices de letras (a o b) de la misma columna para B o C no difieren significativamente a $p \leq 0,05$ .						

Estudios sensoriales para evaluar la aceptabilidad de alimentos y bebidas. El protocolo para estudios sensoriales fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional de Ciencias Sociales y del Comportamiento, UW. Se realizaron tres estudios sensoriales con sujetos con PKU que acudieron a los Campamentos de Verano de PKU en 2004 y 2005 y una conferencia de familia de PKU en 2005 ( $n = 49$ ; intervalo de edad de 12-42 años). Los estudios se realizaron en el Laboratorio de Análisis Sensorial, Departamento de Ciencia de Alimentos, UW o en el Centro Waisman.

Las muestras de ensayo de 20-30 g se presentaron a los sujetos en orden aleatorio equilibrado con códigos con ocultación de tres dígitos. Los alimentos y las bebidas se calificaron usando una escala hedónica de cinco puntos (1, no me gusta nada; 2, no me gusta; 3, ni me gusta ni me disgusta; 4, me gusta; 5, me gusta mucho) para evaluar cinco categorías sensoriales, incluyendo el aspecto, el olor, el sabor, la textura y la aceptabilidad global.

**Análisis estadístico.** Se realizó la prueba t dependiente para analizar las puntuaciones medias de aceptabilidad para la bebida de chocolate con GMP y la bebida de chocolate con aminoácidos. Las medias del grupo se consideraron significativamente diferentes en  $p < 0,05$ , según lo determinado por una prueba t de dos colas usando el paquete de Software de Análisis Estadístico (SAS Institutes Inc., Versión 9.1.3, Cary, NC, EE. UU.). Se compararon las puntuaciones de aceptabilidad para las galletas saladas de GMP y las galletas saladas bajas en proteínas usando un procedimiento de modelo lineal general (PROC GLM) seguido de las medias de mínimos cuadrados de Fisher para la separación media. Los datos se presentan como las medias con desviaciones típicas.

20

## Resultados

Los sujetos con PKU probaron un total de 7 productos durante los eventos de PKU en 2004 y 2005 (Tabla 6). Entre estos alimentos y bebidas, el pudín de fresa de GMP fue el más aceptable (puntuación global de  $4,2 \pm 0,9$ ) y otros alimentos en orden de aceptabilidad global fueron galletas saladas de GMP ( $3,6 \pm 1,4$ ), piel de fresa con GMP ( $3,4 \pm 1,0$ ), bebida de chocolate con GMP ( $3,3 \pm 1,0$ ), bebida deportiva de naranja GMP ( $3,3 \pm 1,1$ ) y galletas saladas bajas en proteínas ( $2,9 \pm 1,3$ ). Una bebida de chocolate con aminoácidos fue menos aceptable ( $2,5 \pm 1,4$ ). Una puntuación de  $< 3$  indica que un alimento o bebida es inaceptable con respecto a una categoría específica, mientras que una puntuación de 3 indica la aceptación neutra.

30

Los sujetos con PKU calificaron el aspecto, el olor, el sabor y la aceptabilidad general de la bebida de chocolate con GMP como significativamente más aceptable en comparación con la bebida a base de aminoácidos ( $p \leq 0,05$ , Tabla 6B). El aspecto, el olor y el sabor de las galletas saladas con GMP se calificaron como significativamente más aceptables en comparación con la galleta salada baja en proteínas ( $p \leq 0,05$ ), pero la aceptabilidad general no fue significativamente diferente entre los dos tipos de galletas (Tabla 6C).

## Discusión

Estos datos demuestran que las propiedades funcionales del GMP son especialmente adecuadas para su uso en bebidas y alimentos semisólidos tales como púdines. Por ejemplo, el GMP es soluble en ácido con un punto isoeléctrico inferior a 3,8, forma geles o espumas, y tiene buena estabilidad térmica. El GMP realmente mejoró el sabor a chocolate usado en la bebida con la característica adicional de que el sabor a chocolate ayudó a enmascarar el sabor a lácteo del GMP. Estos datos sugieren que el GMP se puede usar para fabricar una bebida que sea más apetecible que las fórmulas de aminoácidos actualmente requeridas como la fuente principal de proteína en la dieta para la PKU.

**Ejemplo 3: Estudio de caso de un adulto con PKU después de una dieta de GNP de diez semanas**

El presente ejemplo es un informe de caso de un hombre de 29 años con PKU que usó alimentos a base de GMP como su única fuente de proteínas durante un período de diez semanas. El sujeto del ensayo informó que los alimentos a base de GMP sabían mejor que la fórmula convencional de aminoácidos, y sus niveles en plasma de Phe fueron inferiores en general durante las diez semanas que consumió la dieta a base de GMP.

La Junta de Revisión Institucional de Ciencias de la Salud de la Universidad de Wisconsin-Madison otorgó la aprobación para realizar un estudio ambulatorio en sujetos con PKU para evaluar la seguridad y la aceptabilidad del GMP en la dieta. Se estudió un sujeto con PKU varón de 29 años con un genotipo de R261Q y R408W. El sujeto se adhirió a la dieta baja en Phe desde el nacimiento hasta los 12 años, pero estuvo fuera de la dieta durante la adolescencia, lo que produjo el desarrollo de cuadriparesia espástica y un trastorno convulsivo que se trató con terapia anticonvulsivante convencional. El sujeto completó un estudio de 15 semanas comparando el GMP con su fórmula de aminoácidos prescrita habitual (mezcla de fenilade y aminoácidos, Applied Nutrition, Cedar Knolls, NJ, EE.UU.) como la principal fuente de proteína en la dieta.

El protocolo consistió en una dieta en la que consumió su fórmula habitual de aminoácidos durante las 3 primeras semanas y las 2 últimas semanas del estudio. Durante las 10 semanas intermedias del estudio, los productos alimentarios de GMP escogidos por el sujeto reemplazaron toda la fórmula de aminoácidos e incluyeron: bebida deportiva de naranja con GMP (793,8 g (28 oz)/día, 28 g de proteína), pudín con GMP (1,5 tazas/día; 15 g de proteína) y barrita de GMP (1 barrita/día, 5 g de proteína). Véase la Tabla 7 para la composición nutricional de los alimentos de GMP.

Durante seis semanas del estudio, se enviaron porciones pesadas de alimentos con contenido de Phe controlado con precisión a la casa del sujeto. El contenido de Phe de las dietas se determinó mediante el análisis de alimentos seleccionados para determinar el contenido de aminoácidos y el cálculo del contenido de Phe para los alimentos restantes combinados en cantidad y lote de envase en ambas dietas (Departamento estadounidense de agricultura ARS (2005) USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 18). Durante las 9 semanas restantes del estudio, el sujeto compró y pesó su propia comida usando los menús planificados con el dietista metabólico. Aunque la ingesta de Phe estuvo bien controlada durante 15 semanas, los resultados de las concentraciones de Phe en sangre y plasma presentados en el presente documento se basan en las 6 semanas en que se proporcionó la comida al sujeto.

Tabla 7: Composición nutricional de productos alimentarios de GMP<sup>a</sup>

Producto	Tamaño de la ración	Energía [kJ (kcal)]	Proteína (g)	Phe (mg)
Bebida deportiva de naranja	340 g (12 oz)	419 (100)	12	33
Bebida de chocolate	227 g (8 oz)	628 (150)	10	33
Bebida de caramelo	227 g (8 oz)	670 (160)	10	26
Pudín de fresa	114 g (1/2 taza)	921 (220)	5	13
Pudín de chocolate	114 g (1/2 taza)	921 (220)	5	21
Aderezo ranchero	45 g (1,5 oz)	419(100)	5	15
Barrita crujiente de canela	55 g (1 barrita)	711 (170)	5	14

<sup>a</sup>Los productos alimentarios de GMP se desarrollaron en el centro de investigación de lácteos de Wisconsin, a excepción del aderezo ranchero y de la barrita crujiente de canela, que fueron desarrollados por Cambrooke Foods de Boston.

El perfil de macronutrientes proporcionado por las dietas de aminoácidos y de GMP fue constante, e incluía: 10.880 a 11.300 kJ/día (2.600 a 2.700 kcal/día), 10-11 % de energía de la proteína (0,84 g de proteína/kg), 24-26 % de energía de la grasa y 63-66 % de energía de hidratos de carbono. El sujeto mantuvo un peso corporal de 87 kg durante el estudio. El contenido diario de Phe era 1.100 mg de Phe durante 4 semanas y 1.180 mg de Phe durante 2 semanas; esto proporcionó aproximadamente 13 mg de Phe por kg de peso corporal. La fórmula de aminoácidos y los productos alimentarios de GMP proporcionaron cada uno 0,6 g de proteína por kg de peso corporal. Los productos alimentarios de GMP se complementaron para proporcionar 130 % o 150 % para la tirosina, del patrón de puntuación de aminoácidos para una proteína completa para los siguientes aminoácidos limitantes, expresada en mg de aminoácidos por g de proteína del GMP: histidina, 23; leucina, 72; triptófano, 9; y tirosina, 71. Se tomaron un

complemento multivitamínico/mineral, un complemento de calcio/fósforo y 500 mg de L-tirosina dos veces al día con la dieta de GMP para garantizar las ingestas similares a las proporcionadas por la fórmula de aminoácidos.

5 Se obtuvieron muestras de sangre después de una noche de ayuno y antes del desayuno para la determinación de la concentración de Phe usando uno de dos métodos analíticos conocidos para dar diferentes valores (Gregory *et al* (2007) *Genet Med* 9:761-765). Se usó la espectroscopía de masas en tandem (MS/MS) para el análisis de las concentraciones de Phe en manchas de sangre recogidas en papel de filtro por el sujeto entre las 09:00 y las 09:30 (Rashed *et al.* (1995) *Pediatr Res* 38: 324-331) y se usó un analizador de aminoácidos Beckman 6300 para el análisis del perfil de aminoácidos en plasma obtenido por venopunción en una clínica de la zona entre las 12:00 y las 10 12:30 (Slocum y Cummings (1991), "Amino Acid Analysis of Physiological Samples, in Hommes", FA, ed., Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual. Nueva York: Wiley-Liss, 87-126).

15 Se evaluaron las diferencias estadísticas en las concentraciones de aminoácido en sangre y en plasma para los períodos de dieta de aminoácidos y GMP mediante la prueba t con el supuesto de que las mediciones de aminoácidos eran independientes en el tiempo;  $p < 0,05$  se consideró significativo. Cuando se expresaron en relación con 100 mg de ingesta de Phe basándose en el suministro de comidas con contenido conocido de Phe, las concentraciones de Phe en plasma y en sangre en ayunas se redujeron significativamente en 13-14 % con el consumo de la dieta de GMP en comparación con la dieta de aminoácidos (Fig. 5). La concentración absoluta de Phe en plasma se redujo en aproximadamente un 10 % (de 736 a 667 mmol/l) con el consumo de la dieta de GMP en comparación con la dieta de aminoácidos (véase la Tabla 8). La concentración de tirosina en plasma no fue significativamente diferente con las dietas de GMP y aminoácidos. No se observaron efectos adversos con el consumo de la dieta de GMP basándose en los exámenes físicos y los resultados de los análisis de paneles de química que incluyeron electrolitos, albúmina, prealbúmina y pruebas de función hepática.

20 25 De acuerdo con el perfil de aminoácidos de GMP y los estudios en el ratón con PKU (véase el Ejemplo 1), se observaron aumentos significativos en las concentraciones en plasma de AANG con la ingesta de la dieta de GMP en comparación con la dieta de aminoácidos (Tabla 8). La treonina aumentó 2,6 veces, la isoleucina aumentó 1,7 veces y la suma de los aminoácidos de cadena ramificada aumentó un 16 % con la dieta de GMP. Curiosamente, este sujeto recibió previamente una prueba de complementación con una mezcla de AANG indispensable (PreKUnil; 30 NiLab, Korsør, Dinamarca), pero esta se detuvo debido a que sus convulsiones empeoraron. La preparación de AANG contenía una mayor proporción de aminoácidos de tirosina y triptófano, y proporcionalmente menos de treonina y aminoácidos de cadena ramificada que GMP, que contiene aproximadamente el 80 % del contenido de aminoácidos indispensable de una combinación de treonina y los aminoácidos de cadena ramificada. Por lo tanto, 35 GMP parece proporcionar una fuente dietética segura de AANG para este sujeto. La concentración en plasma de prolina aumentó un 40 % con la dieta de GMP en asociación con un aumento del doble en la ingesta de prolina con GMP en comparación con la fórmula de aminoácidos. Hubo un pequeño aumento en la concentración en plasma de glutamina y citrulina con la dieta de GMP en comparación con la dieta de aminoácidos que no se asoció con un cambio en las pruebas de función hepática.

40 Tabla 8: Concentraciones of aminoácidos en plasma en ayunas con la ingesta de la dieta de aminoácidos en comparación con la dieta de GMP en un solo sujeto con PKU<sup>a</sup>

Aminoácido	Concentración (μmol/l)		
	Dieta de aminoácidos	Dieta de GMP	Intervalo normal
Alanina	296 ± 26	331 ± 5	177-583
Arginina	58 ± 2	62 ± 3	15-128
Citrulina	26 ± 2	48 ± 7*	12-55
Cistina	31 ± 1	42 ± 5	5-82
Glutamato	46 ± 10	53 ± 7	10-131
Glutamina	698 ± 22	858 ± 16**	205-756
Glicina	428 ± 7	428 ± 22	151-490
Histidina	69 ± 3	75 ± 2	41-125
Isoleucina	42 ± 3	69 ± 1**	30-108
Leucina	92 ± 3	91 ± 3	72-201
Lisina	189 ± 8	201 ± 5	48-284
Metionina	19 ± 1	19 ± 3	10-42
Ornitina	61 ± 7	51 ± 6	48-195
Fenilalanina	736 ± 13	667 ± 24 <sup>b</sup>	35-85
Prolina	153 ± 7	214 ± 13**	97-329
Serina	95 ± 1	88 ± 8	58-181
Taurina	65 ± 6	59 ± 13	54-210
Treonina	95 ± 4	246 ± 12**	60-225
Triptófano	33 ± 2	35 ± 2	10-140
Tirosina	53 ± 5	45 ± 6	34-112
Valina	241 ± 15	275 ± 14	119-336
BCAAc	374 ± 17	435 ± 15*	221-645

Aminoácido	Concentración ( $\mu\text{mol/l}$ )		
	Dieta de aminoácidos	Dieta de GMP	Intervalo normal
*	**Diferente de la dieta de AA, * $p < 0,05$ , ** $p < 0,41$ .		
<sup>a</sup> Los valores son las medias $\pm$ ET, $n = 4$ ; las muestras de sangre se obtuvieron tras ayuno nocturno y antes del desayuno entre las 12:00 y 12:30 en diferentes días distribuidos en las 5 semanas de la dieta de aminoácidos y las 10 semanas de la dieta de GMP.			
<sup>b</sup> $p = 0,073$ .			
<sup>c</sup> BCAA = suma de leucina, isoleucina y valina.			

En general, el sujeto disfrutó de la dieta de GMP e informó que se sentía más alerta con esa dieta que con su dieta habitual de aminoácidos. Debido a que el sujeto disfrutó de los productos alimentarios de GMP, estuvo más inclinado a distribuirlos a lo largo del día. Consumió productos alimentarios de GMP aproximadamente tres veces al día en comparación con una vez al día para la fórmula de aminoácidos. Es bien sabido que el espaciamiento de los alimentos medicinales de aminoácidos para la PKU a lo largo del día reduce los niveles de Phe en sangre debido a la utilización mejorada de aminoácidos para la síntesis de proteínas. Por lo tanto, una explicación para los niveles reducidos de Phe en sangre con el consumo de GMP es la mejor síntesis de proteína debido al consumo de una cantidad suficiente de proteína de alta calidad a lo largo del día. Como alternativa, la mayor ingesta de AANG con GMP puede haber contribuido a la reducción de los niveles en plasma de Phe, en particular, la ingesta alta de treonina (~70 mg por kg por día).

En suma, el cumplimiento de la dieta baja en Phe altamente restrictiva requerida para el tratamiento de la PKU sigue siendo pobre durante la adolescencia y la edad adulta, dando lugar a niveles de Phe en sangre elevados, deterioro neuropsicológico y consecuencias trágicas de PKU materna. El GMP de la dieta, un ingrediente alimentario abundante, naturalmente bajo en contenido de Phe, proporciona un enfoque innovador para mejorar el tratamiento nutricional de la PKU. Este ejemplo indica que la incorporación de alimentos y bebidas bajos en Phe elaborados con GMP en la dieta de PKU mejora el sabor, la variedad y la conveniencia de la dieta. Una dieta baja en Phe más sabrosa y versátil puede conducir a un mejor cumplimiento de la dieta, al control metabólico y, en última instancia, a la calidad de vida para las personas con PKU.

Ejemplo 4: Ensayo clínico de once sujetos en el que se compara el GMP complementado con aminoácidos limitantes con la fórmula de aminoácidos como fuente de proteínas primaria para el tratamiento nutricional de la PKU.

- Este ejemplo muestra que una dieta en la que se usa el GMP complementado con aminoácidos limitantes como fuente de proteínas es una alternativa segura y altamente aceptable para las fórmulas de AA sintéticas en el tratamiento nutricional de la PKU. Como fuente de proteínas intacta, el GMP mejora la retención de proteínas y la utilización de fenilalanina en comparación con los AA.
- Para evaluar además los posibles beneficios del GMP en la dieta para la PKU, se realizó una investigación clínica de 8 días en individuos con PKU. El objetivo fue investigar los efectos de la sustitución de los productos alimentarios de GMP por la fórmula de AA sobre la aceptabilidad, la seguridad, las concentraciones en plasma de AA y las medidas de utilización de proteínas en sujetos con PKU.

#### 35 Sujetos y métodos

**Sujetos.** Doce sujetos con PKU que fueron controlados rutinariamente en el Programa de Genética Bioquímica, Waisman Center, Universidad de Wisconsin-Madison, participaron en este estudio entre marzo de 2006 y junio de 2008. Un sujeto (edad: 10 años) se retiró del estudio porque no pudo completar el protocolo. Por lo tanto, los datos de 11 sujetos (intervalo de edad: 11-31 años, 7 varones y 4 mujeres) se informan (véase la Tabla 9). La Junta de Revisión Institucional de Ciencias de la Salud de la Universidad de Wisconsin-Madison aprobó este estudio.

Los criterios de participación incluyeron un diagnóstico de PKU clásica o variante y una disposición a consumir  $\geq 50$  % del volumen prescrito de la fórmula de AA. Sin embargo, el control óptimo de las concentraciones en plasma de fenilalanina no era un requisito previo para la participación. El control óptimo incluye el mantenimiento de concentraciones de fenilalanina entre 120 y 360  $\mu\text{mol/l}$  para recién nacidos hasta la edad de 12 años, entre 120 y 600  $\mu\text{mol/l}$  para adolescentes y < 900  $\mu\text{mol/l}$  para adultos. El diagnóstico de PKU se basó en la concentración de fenilalanina medida antes del inicio del tratamiento dietético durante la infancia; aquellos con PKU clásica muestran concentraciones de fenilalanina de  $\geq 1.200 \mu\text{mol/l}$  (véase la Tabla 9). Todos los sujetos de este estudio fueron diagnosticados con PKU clásica, a excepción de un sujeto que se determinó que tenía una variante de PKU (sujeto 1).

Se completó el análisis de mutaciones para cada sujeto mediante secuenciación de ADN del gen PAH (Sección de Servicio de Laboratorio, Departamento de Estado de Servicios Sanitarios de Texas, Austin, TX) usando los cebadores diseñados por Guldberg *et al.* (*Hum Mol Genet* 1993; 2:1703-7). Todos los sujetos fueron heterocigotos compuestos para las mutaciones de PAH (Tabla 9). Cinco sujetos mostraron 2 copias de mutaciones consideradas para expresar principalmente un fenotipo clásico y 6 sujetos mostraron una mutación clásica y una mutación observada en pacientes con PKU con mutaciones de hiperfenilalaninemia variante y/o no PKU.

Debido a que no se había completado una evaluación formal de la prescripción dietética de cada sujeto en el transcurso de los 2 años posteriores al reclutamiento del estudio, se determinó una asignación de fenilalanina para todos los sujetos antes de iniciarse el estudio. Para este estudio, la asignación de fenilalanina se definió como la cantidad de ingesta de fenilalanina en la dieta que permitió una concentración constante de fenilalanina en plasma (65 % de varianza) determinada por aumentos secuenciales en la ingesta de fenilalanina con monitorización frecuente de las concentraciones de fenilalanina en sangre en las manchas de sangre. La asignación de fenilalanina en la dieta de cada sujeto se verificó completando una o más "ciclos en seco" en las que se proporcionaron alimentos, bebidas y fórmula durante un período de 5 días con mediciones de concentraciones de fenilalanina en manchas de sangre antes y al final de cada ciclo. Las concentraciones en plasma de fenilalanina al inicio del estudio variaron de 192  $\mu\text{mol/l}$  (sujeto 10) a 1.011  $\mu\text{mol/l}$  (sujeto 2, tabla 9). Para mantener estas concentraciones en plasma de fenilalanina, la asignación dietética de fenilalanina para los sujetos varió de 5,8 mg/kg (sujeto 10) a 26,7 mg/kg (sujeto 2).

Tabla 9: Características individuales de 11 sujetos con fenilcetonuria

nº de sujeto/sexo	Edad al inicio del estudio	Altura/peso	Concentración de fenilalanina en el diagnóstico	Edad en el diagnóstico	Mutación	Fenilalanina en plasma basal <sup>2</sup>	Asignación de fenilalanina en la dieta al día	Asignación de fenilalanina fenilalanina en la dieta por kg
		cm/kg	µmol/l	d		µmol/l	mg	mg
1/V	y 27	173/73	1.270	35	R408W IVS12nt1g→ a	640	1.151	15,8
2/V	29	170/67	2.208	15	R408W R261Q	1.011	1.793	26,7
3/V	14	164/52	1.210	8	R408W IVS10nt- 11g→a	1.009	673	13,0
4/V	11	137/35	2.051	7	IVS4nt5g→t IVS12nt1g→ a	767	372	10,7
5/V	12	148/45	2.154	7	R408W Y356N	690	979	21,6
6/M	23	94/51	1.488	10	R408W IVS12nt1g→ a	536	545	10,6
7/M	28	159/64	2.632	11	R408W L242F	603	545	8,3
8/V	27	170/76	1.924	11	R261Q E280K	810	971	12,8
9/M	20	93/64	1.016	10	L48S F299C	331	378	5,9
10/M	31	157/70	1.876	15	R408W F299C	192	408	5,8
11/V	28	180/91	3.122	13	IVS1nt5g→t IVS12nt1g→ a	392	711	7,8

1. La edad y las concentraciones de fenilalanina en el momento del diagnóstico representan valores cuando el tratamiento con la dieta se inició durante la infancia.
2. Los valores representan concentraciones de fenilalanina en plasma 2,5 h después de desayunar el día 3 mientras consumían la dieta de aminoácidos prescrita.

5 *Protocolo de estudio.* Cada sujeto sirvió como su propio control en este estudio metabólico, que incluyó 2 tratamientos dietéticos de 4 días cada uno: la dieta de AA (días 1-4) y la dieta de GMP (días 5-8). Se diseñó un menú de 24 horas para la dieta de AA y otro para la dieta de GMP; el mismo menú se repitió todos los días de cada tratamiento dietético (Tabla 10). En cada dieta, la fórmula de AA o los productos de GMP se dividieron por igual en 10 cada una de las 3 comidas durante el día. La distribución de equivalentes proteicos a lo largo del día mejora la utilización de proteínas y puede reducir las concentraciones en plasma de fenilalanina. Durante el estudio, todos los 15 alimentos, bebidas, refrigerios, fórmulas y productos de GMP en gramos fueron pesados por el personal dietista capacitado en el Centro Waisman o en el Centro de Investigación Clínica y Translacional de la Universidad de Wisconsin (UW-CTRC). Para garantizar la ingesta idéntica en todos los días del estudio, se alentó a los sujetos a que consumieran todos los alimentos y bebidas. Todos los sujetos lo hicieron.

TABLA 10: Comparación de los menús típicos para las dietas de aminoácidos (AA) y las dietas de glicomacropéptido (GMP)<sup>1</sup>

Dieta de AA	Dieta de GMP
<p>Desayuno (103 mg de Fenilalanina, 14 g de proteína) 177 ml de fórmula de PKU<sup>2</sup> (0 mg de Fenilalanina)</p> <p>30 g de cereal frío (51 mg de Fenilalanina) 11 g de Pretzels (52 mg de Fenilalanina)</p> <p>Comida (124 mg de Fenilalanina, 15 g de proteína) 177 ml de fórmula de PKU<sup>2</sup> (0 mg de Fenilalanina)</p> <p>12,5 g de tostada de canela (62 mg de Fenilalanina)</p> <p>Sándwich de queso (45 mg de Fenilalanina; 64 g de pan bajo en proteínas) 1 loncha de queso bajo en proteínas, 8,7 g de mantequilla)</p> <p>125 g melocotón (17 mg de Fenilalanina)</p> <p>Cena (220 mg de Fenilalanina, 18 g de proteína) 177 ml de fórmula de PKU<sup>2</sup> (0 mg de Fenilalanina)</p> <p>9 g pasta Bowtie (53 mg de Fenilalanina)</p> <p>Pasta Alfredo (61 mg de Fenilalanina; 60 g pasta baja en proteínas, 5 g pasta bowtie normal, 88 g salsa Alfredo baja en proteínas)</p> <p>92 g de brócoli, 50 g de zanahorias y 14 g de mantequilla (105 mg de Fenilalanina)</p> <p>140 g de pera (7 mg de Fenilalanina)</p> <p>237 ml de limonada (0 mg de Fenilalanina)</p>	<p>Desayuno (102 mg de Fenilalanina, 14 g de proteína) 296 ml de bebida de chocolate con GMP (51 mg de fenilalanina)</p> <p>30 g de cereal frío (51 mg de Fenilalanina)</p> <p>Comida (124 mg de Fenilalanina, 13 g de proteína) 148 ml de bebida de chocolate con GMP (24 mg de fenilalanina)</p> <p>113 g (1/2 taza) de pudín de chocolate con GMP (38 mg de Fenilalanina)</p> <p>Sándwich de queso (45 mg de Fenilalanina; 64 g de pan bajo en proteínas, 1 loncha de queso bajo en proteínas, 8,7 g de mantequilla)</p> <p>125 g de melocotón (17 mg de Fenilalanina)</p> <p>Cena (226 mg de Fenilalanina, 18 g de proteína) 1 barrita de GMP (33 mg de Fenilalanina)</p> <p>237 ml de bebida deportiva con GMP (19 mg de Fenilalanina)</p> <p>Pasta Alfredo (61 mg de Fenilalanina; 60 g de pasta baja en proteínas, 5 g de pasta bowtie normal, 88 g de salsa Alfredo baja en proteínas)</p> <p>92 g de brócoli, 50 g de zanahorias y 14 g de mantequilla (105 mg de Fenilalanina)</p> <p>140 g de pera (7 mg de Fenilalanina)</p> <p>237 ml de limonada (0 mg de Fenilalanina)</p>

<sup>1</sup>Todos los alimentos fueron medidos en gramos por personal capacitado. Desde que se completó este estudio, se han desarrollado mejores recetas para bajar más el contenido de fenilalanina de todos los productos de GMP mostrados en este menú tipo (12). Por ejemplo, ahora se puede producir una barrita de GMP con solo 14 mg de Fenilalanina en comparación con 33 mg de Fenilalanina, y el pudín de chocolate con GMP ahora contiene 21 mg de fenilalanina en comparación con 38 mg de fenilalanina de la formulación original usada para la presente investigación. PKU, fenilcetonuria.

<sup>2</sup>La fórmula de PKU usada en este menú es 40 g de Phenex 2 (Abbott Laboratories, Columbus, OH).

20 Cada sujeto recibió toda la comida y la fórmula para consumir en casa durante 2 días antes del inicio del estudio y durante los días 1 y 2 de la dieta de AA. Antes de la cena del día 2, cada sujeto fue admitido en el UW-CTRC para continuar con la dieta de AA (días 3 y 4) y durante 4 días con la dieta de GMP (días 5-8). Se completó un examen físico todos los días de la admisión del UW-CTRC. Se requirió que todos los sujetos caminaran o completaran una actividad física 2-3 veces/día para permitir un nivel de actividad uniforme con su rutina habitual. La hora de las comidas y los refrigerios también fue similar a la rutina habitual de cada sujeto.

En los días 1 y 2, cada sujeto recogió una mancha de sangre en papel de filtro para el análisis de la fenilalanina y la tirosina. Durante la admisión en el UW-CTRC, se extrajo sangre diariamente para análisis químicos automáticos y de AA en plasma para medir las concentraciones en suero de prealbúmina, albúmina, proteína total, electrolitos, glucosa, nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina, calcio, magnesio, fosfato, ácido úrico, bilirrubina total y directa, fosfatasa alcalina y enzimas hepáticas ( $\gamma$ -glutamiltranspeptidasa, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y deshidrogenasa láctica). Todas las muestras de sangre postprandiales se tomaron diariamente 30

h después del inicio del desayuno o 2,5 h después del desayuno (días 3-8).

- Una vez que los 5 primeros sujetos hubieran completado el protocolo, la Junta de Seguridad y Control de Datos evaluó el protocolo y el progreso del estudio. Como resultado de las sugerencias de la Junta, se extrajeron muestras de sangre para paneles de química en los 2 primeros días de la dieta de GMP (días 5 y 6) y se añadió una muestra adicional de sangre en ayunas antes del desayuno en los 2 últimos días de la dieta de AA (días 3 y 4) y en los 2 últimos días de la dieta de GMP (días 7 y 8) para los 6 sujetos restantes. Todas las muestras en ayunas se analizaron para determinar los AA en plasma. La edad media de los 6 sujetos para los que se obtuvieron muestras de sangre en ayunas y postprandiales fue de  $26 \pm 2$  años e incluyó 4 mujeres y 2 varones (sujetos 6-11, Tabla 9).
- Debido a que los productos alimentarios de GMP no se complementaron con vitaminas y minerales, todos los sujetos recibieron un multivitamínico completo con complemento mineral (Phlexy-Vits; Nutritia North America, Gaithersburg, MD) o una combinación de Theragran M (Walgreen Co, Deerfield, IL) y Target-Mins (Country Life, Hauppauge, NY) durante la dieta de GMP. Cualquier sujeto que consumió una fórmula o fórmulas que no contuvieran vitaminas y minerales recibió los mismos complementos proporcionados para la dieta de GMP durante la dieta de AA. Se suministró calcio adicional, en caso necesario, para cumplir con las recomendaciones de aportes dietéticos de referencia (ADR) según la edad (Instituto de Medicina, aportes dietéticos de referencia para energía, hidratos de carbono, fibra, grasa, proteínas y aminoácidos, Washington DC: National Academy Press, 2002).
- Dietas de estudio.* Se analizó el GMP (Bio-Pure GMP, Davisco, Le Sueur, MN) para determinar el contenido de AA en el Laboratorio de Química de la Estación Experimental de la Universidad de Missouri. El contenido de fenilalanina para el GMP comercial era de 0,4 g de fenilalanina/100 g de GMP con un contenido de proteína de 86,0 g/100 g de GMP. Este GMP se usó para 3 sujetos con una mayor tolerancia a la fenilalanina. Para 9 sujetos con una menor tolerancia a la fenilalanina, se purificó la materia prima original de GMP para reducir el contenido de fenilalanina hasta una media de  $0,21 \pm 0,01$  g de fenilalanina/100 g de GMP con un contenido medio de proteína de  $75,0 \pm 0,7$  g/100 g de GMP. La purificación del GMP disminuyó solo el contenido de fenilalanina; la proporción de los otros AA permaneció sin cambios en el GMP purificado en comparación con el GMP comercial.
- Se complementó el GMP con 4 AA limitantes, expresados como la concentración final en miligramos de AA por gramo de proteína de GMP: histidina, 23; leucina, 72; metionina, 28; y triptófano, 9. Esto equivale al 130 % de las necesidades estimadas basándose en las ADR de 2002 (Instituto de Medicina, aportes dietéticos de referencia para energía, hidratos de carbono, fibra, grasa, proteínas y aminoácidos, Washington DC: National Academy Press, 2002). Debido a que la tirosina es un AA indispensable en la PKU, la tirosina se complementó al 150 % de las necesidades estimadas para una concentración final de 71 mg/g de proteína de GMP. Para la dieta de GMP, no se intentó duplicar la concentración de tirosina complementaria encontrada en las diversas fórmulas consumidas por cada sujeto, porque, en la mayoría de los casos, el contenido de tirosina de la fórmula fue sustancialmente mayor que las necesidades estimadas. Por lo tanto, para todos los sujetos, la ingesta de tirosina en la dieta de AA fue mayor que la tirosina consumida cuando se sustituyeron los productos de GMP.
- Los productos alimentarios bajos en fenilalanina elaborados con GMP como fuente de proteínas se han desarrollado para este estudio realizado por el Centro de Wisconsin para la Investigación de Productos Lácteos, Universidad de Wisconsin-Madison. Antes del inicio del estudio, cada sujeto probó una variedad de productos alimentarios preparados con GMP, y seleccionó de 2 a 3 productos que se incluirían en los menús para la dieta de GMP. Las bebidas de GMP y los alimentos incluyeron una bebida deportiva con sabor a naranja, una bebida con sabor a chocolate o caramelizada, pudín de chocolate o de fresa y una barrita crujiente de canela (como en el Ejemplo 3, véase la Tabla 7). El intervalo de contenido de fenilalanina en los productos alimentarios de GMP varió con la pureza del GMP y los ingredientes adicionales usados para producir estos alimentos y bebidas, pero, en general, una porción de productos alimentarios de GMP proporcionó 5-10 g de proteína y 15-30 mg de fenilalanina.
- Composición de la dieta.* Las dietas de AA y de GMP se calcularon basándose en una evaluación previa al estudio de la asignación de fenilalanina de cada sujeto, y se controlaron para la energía, la proteína, la fenilalanina y la grasa (véase Tabla 11). La dieta de AA (días 1-4) incluyó la fórmula de AA habitual de un sujeto, que era diferente para cada sujeto. Para la dieta de GMP (días 5-8), los productos de GMP fueron sustituidos por la ingesta diaria completa de un sujeto con fórmula de AA. El contenido de fenilalanina de los alimentos usados para planificar los menús se determinó mediante el análisis de AA de los alimentos seleccionados y mediante el cálculo del contenido de fenilalanina para los alimentos restantes. Los alimentos que no se analizaron se combinaron en cantidad, marca y lote de envase en ambas dietas, mientras que los alimentos analizados para determinar el contenido de fenilalanina se usaron en cantidades variables para dar cuenta del contenido de fenilalanina de los productos de GMP.
- Debido a las limitaciones en los datos para cuantificar el contenido de fenilalanina de los alimentos, se recogieron compuestos dietéticos para el análisis de la fenilalanina para verificar los cálculos del contenido de fenilalanina. Por lo tanto, se recogió un duplicado de todos los alimentos, fórmulas y productos alimentarios de GMP consumidos por cada sujeto durante un período de 24 horas durante 2 días durante la dieta de AA y la dieta de GMP. Cada duplicado se molvió y se liofilizó, y se envió una alícuota de cada material compuesto a la Universidad de Missouri para su análisis. Al comparar los análisis de los materiales compuestos para cada sujeto, el contenido de fenilalanina en la dieta de AA y la dieta de GMP no fue significativamente diferente ( $p = 0,061$ ).

Tabla 11: Composición de nutrientes de dietas de aminoácidos (AA) y de glicomacropéptido (GMP)<sup>1</sup>

	Dieta de AA	Dieta de GMP
Energía (kcal/kg)		
<18 años	56 ± 6	57 ± 5
≥ 18 años	35 ± 1	35 ± 2
Energía de proteína (%) <sup>2</sup>	11 ± 1	10 ± 1
Energía de grasas (%) <sup>3</sup>	24 ± 1	23 ± 1
Ingesta de fenilalanina (mg • kg <sup>-1</sup> • d <sup>-1</sup> )	13 ± 2	13 ± 2
Ingesta de tirosina (mg • kg <sup>-1</sup> • d <sup>-1</sup> )	85 ± 9	51 ± 5 <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Los valores son las medias ± ETM, y se basan en la ingesta calculada de la dieta; n = 11.  
<sup>2</sup>La proteína de los AA sintéticos representa el 75 % de la proteína total en la dieta de AA y solo el 10% de la proteína total en la dieta de GMP (de la complementación del GMP con los AA indispensables limitantes). El resto de proteínas en las dietas de AA y GMP procede de fuentes naturales de proteínas intactas.  
<sup>3</sup>La ingesta total de grasa varió del 18 % al 31 % de la energía. La ingesta baja en grasas es típica de las personas con fenilcetonuria, dada la selección de alimentos a base de hidratos de carbono y el bajo contenido de grasa de muchas fórmulas de AA diseñadas para personas mayores con este trastorno (28).  
<sup>4</sup>Significativamente diferente de la dieta de AA, p <0,0001 (prueba t pareada, emparejamiento del sujeto).

Mediciones. Se analizaron las manchas de sangre recogidas por cada sujeto para establecer su asignación de fenilalanina y en el estudio previo los días 1 y 2 para determinar la fenilalanina y tirosina mediante espectrometría de masas en tandem (MS/MS; no se muestran los datos). Se completó un perfil de AA en todas las muestras de plasma en ayunas y postprandiales recogidas los días 3-8 mediante el uso de un analizador de aminoácidos Beckman 6300 (Beckman-Coulter Inc, Fullerton, CA) dotado de un sistema de cromatografía iónica que usa derivatización de ninhidrina postcolumna. Las muestras se desproteinizaron con ácido sulfosalicílico, se centrifugaron (14.000 x g, 5 min, y se pasaron a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm antes de añadir un patrón interno e inyectarlo en la columna.

Los perfiles de química en suero se analizaron usando técnicas convencionales en el Laboratorio Clínico, Hospital y Clínicas de la Universidad de Wisconsin-Madison. Se midió la insulina en plasma en muestras postprandiales mediante el uso de un radioinmunoensayo específico de la insulina humana (Linco Research, St Charles, MO) en muestras agrupadas en sujetos durante días 3 + 4 y días 7 + 8. Se midió el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) en muestras de plasma postprandial durante los días 4 y 8 tras la eliminación de las proteínas de unión al IGF mediante HPLC; la recuperación de IGF-1 fue del 85-90 %.

Análisis estadístico. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico R para Mac OS X versión 1.12 (R Project for Statistical Computing, Wirtschaftsuniversität, Viena, Austria). Una vez analizados los compuestos dietéticos, se promediaron los valores de AA de cada dieta para cada sujeto (n = 2), y luego se compararon los valores entre ambas dietas usando las pruebas t pareadas. Además, se realizaron pruebas t pareadas, emparejamiento en el sujeto, para comparar los valores de AA en plasma desde el último día de la dieta de AA (día 4) hasta el último día de la dieta de GMP (día 8) tanto para muestras postprandiales como en ayunas. Se compararon los cambios en el panel de química y las pruebas de función hepática usando el mismo método. Además, se realizaron pruebas t pareadas para comparar las concentraciones de AA en ayunas y postprandiales de cada dieta en el subconjunto de 6 sujetos de los que se disponía de plasma en ayunas. Todas las comparaciones se consideraron estadísticamente significativas si p ≤ 0,05. Basándose en el criterio de valoración primario que compara la concentración de fenilalanina en plasma en el último día de la dieta de AA (día 4) con el último día de la dieta de GMP (día 8), el tamaño de muestra alcanzado (n = 11) fue suficiente para proporcionar el 80 % de potencia a p = 0,05 si el cambio en la concentración en plasma de fenilalanina fue de 150 µmol/l.

## Resultados

- Aceptabilidad de la dieta y composición de AA. Después de consumir la dieta de GMP durante 4 días, 10 de los 11 sujetos afirmaron que los productos de GMP eran superiores en cualidades sensoriales a su fórmula habitual de AA. Además, al final del estudio, 6 de los 7 sujetos adultos expresaron una fuerte preferencia por consumir productos de GMP en lugar de su fórmula habitual de AA si pudieran disponer del GMP como una opción dietética.
- En comparación con las recomendaciones actuales, la ingesta analizada (mg de aminoácidos/g de proteína en la dieta) de todos los AA indispensables cubría las necesidades para las dietas de AA y de GMP (Organización Mundial de la Salud, necesidades de proteínas y aminoácidos en la nutrición humana, Ginebra Suiza: Universidad de las Naciones Unidas, 2007). Sin embargo, el análisis de AA de los compuestos de la dieta indicó varias diferencias significativas en la ingesta de AA con la ingesta de la dieta de AA en comparación con la dieta de GMP (véase la Tabla 12). Debido a que el GMP contiene una alta concentración de treonina e isoleucina de AANG, la

ingesta media de estos dos AA fue significativamente mayor con el GMP que con la dieta de AA. A pesar de la complementación de GMP con tirosina al 150 % de la ADR y leucina, histidina, triptófano y metionina al 130 % de la ADR, la ingesta de estos AA, a excepción de la metionina, fue significativamente menor con el GMP que con la dieta de AA. Las ingestas de otros AA que fueron significativamente inferiores con la ingesta de la dieta de GMP en comparación con la dieta de AA incluía el AA indispensable lisina y los AA prescindibles arginina, alanina, glicina y taurina.

5 Tabla 12: Perfil analizado de aminoácidos (AA) de los compuestos de 24 h de dietas de AA y de glicomacropéptido (GMP)<sup>1</sup>

AA	Dieta de AA	Dieta de GMP	Valor <i>p</i> <sup>2</sup>
g de aminoácido/dieta de 24 h			
Alanina	4,08 ± 0,32	3,15 ± 0,07	0,039
Arginina	4,07 ± 0,23	0,80 ± 0,09	<0,0001
Ácido aspártico	6,09 ± 0,37	5,08 ± 0,25	0,059
Cisteína	143 ± 0,09	0,50 ± 0,05	<0,0001
Ácido glutámico	10,3 ± 0,90	11,6 ± 0,64	0,219
Glicina	3,52 ± 0,26	0,99 ± 0,07	<0,0001
Histidina	1,89 ± 0,10	1,27 ± 0,09	0,001
Isoleucina	3,70 ± 0,16	4,75 ± 0,26	0,004
Leucina	6,51 ± 0,35	4,12 ± 0,28	<0,0001
Lisina	4,53 ± 0,21	3,09 ± 0,17	<0,0001
Metionina	1,24 ± 0,06	1,28 ± 0,08	0,605
Fenilalanina	0,79 ± 0,09	0,74 ± 0,08	0,061
Prolina	5,27 ± 0,27	591 ± 0,32	0,198
Serina	3,27 ± 0,26	3,30 ± 0,18	0,883
Taurina	0,54 ± 0,08	0,25 ± 0,03	0,019
Treonina	3,00 ± 0,10	7,12 ± 0,41	<0,0001
Triptófano	1,07 ± 0,07	0,57 ± 0,05	<0,0001
Tirosina	4,40 ± 0,17	2,63 ± 0,21	<0,0001
Valina	4,50 ± 0,14	4,13 ± 0,21	0,105
BCAA	14,72 ± 0,62	13,00 ± 0,72	0,034

10 <sup>1</sup>Los valores son las medias ± ETM; *n* = 22, BCAA, suma de leucina, isoleucina y valina.

15 <sup>2</sup>Representa la diferencia entre las dietas de AA y de GMP mediante la prueba *t* pareada.

20 Examen físico y química sanguínea. No se detectaron ni expresaron por ninguno de los sujetos problemas físicos en el examen que indicaran algún efecto negativo en el estado de salud cuando los sujetos consumieron GMP como la principal fuente de proteínas durante un período de 4 días. No hubo diferencias significativas entre las concentraciones en suero de albúmina, prealbúmina o proteína total como indicadores del estado de la proteína o de la creatinina como un indicador del estado renal medido en el último día de la dieta de AA (día 4) en comparación con la dieta de GMP (día 8; Tabla 13). Sin embargo, el BUN como indicador de la ureagénesis hepática fue significativamente menor con la ingesta de la dieta de GMP tanto en el día 7 como en el día 8 que con la dieta de AA en el día 4 (véase la Figura 6). La concentración en plasma de IGF-I no fue significativamente diferente con las dietas de AA y GMP, lo que sugiere una nutrición proteica adecuada en ambas dietas. La concentración de insulina en plasma fue mayor y marginalmente significativa con la dieta de GMP en comparación con la dieta de AA (*p* = 0,053), y la concentración en suero de glucosa no fue significativamente diferente. El contenido de dióxido de carbono en suero, que es principalmente bicarbonato, fue significativamente mayor con la dieta de GMP en comparación con la dieta de AA, lo que coincide con un contenido inferior de ácido sistémico. Las concentraciones medias de otras químicas convencionales, incluyendo electrolitos y pruebas de función hepática, permanecieron en el intervalo normal con ambas dietas (datos no mostrados). La excepción fueron las concentraciones elevadas de diversas pruebas de función hepática (alanina aminotransferasa y γ-glutamiltranspeptidasa) medidas en el sujeto 2, que tomaba medicamentos anticonvulsivos para su trastorno convulsivo. Sin embargo, no se detectaron aumentos adicionales en estas pruebas de función hepática con la ingesta de la dieta de GMP en comparación con las elevaciones medidas al ingreso al estudio.

25 30 Tabla 13: Efecto de las dietas de aminoácidos (AA) y glicomacropéptido (GMP) en los índices postprandiales del metabolismo de las proteínas y de la glucosa<sup>1</sup>

Análisis	Dieta de AA	Dieta de GMP	Valor <i>p</i> <sup>2</sup>
Nitrógeno ureico en sangre (mmol/l)	4,2 ± 0,3	3,4 ± 0,2	0,02

Análisis	Dieta de AA	Dieta de GMP	Valor $p^2$
Creatinina ( $\mu\text{mol/l}$ )	73 ± 5,5	73 ± 4,6	1,00
Proteína total (g/l)	68 ± 1,4	67 ± 1,4	0,27
Albúmina (g/l)	44 ± 0,9	44 ± 0,8	0,84
Prealbúmina (g/l)	317 ± 7,5	310 ± 7,3	0,22
Factor de crecimiento de tipo insulina I (nmol/l)	13,5 ± 1,3	13,7 ± 1,5	0,14
Insulina (pmol/l)	84 ± 22	116 ± 34	0,05
Glucosa (mmol/l)	4,5 ± 0,1	4,8 ± 0,1	0,14
Contenido de $\text{CO}_2$ (mmol/l)	26 ± 0,6	28 ± 0,6	0,01

<sup>1</sup>Los valores son las medias ± ETM; n = 11, excepto proteína total e insulina para las que n = 10; todos los valores están dentro del intervalo normal. Los valores son para el suero excepto aquellos para el factor de crecimiento similar a la insulina I y la insulina, en los que se usó plasma.

<sup>2</sup>Diferencia entre el último día de la dieta de AA (día 4) y dieta de GMP (día 8) mediante una prueba t pareada, emparejamiento con el sujeto.

**Concentraciones de AA en plasma.** La concentración de AA totales en plasma fue significativamente superior, y la concentración de BUN fue significativamente inferior, con la dieta de GMP en comparación con la dieta de AA cuando se midió 2,5 h después de tomarse el desayuno (véase la Figura 6). Esto coincide con la absorción más lenta de los AA de una fuente intacta de proteína en comparación con los AA sintéticos y las concentraciones mayores de insulina con la ingesta de GMP.

5 Concentraciones de fenilalanina y tirosina. No hubo diferencias significativas ( $p = 0,173$ ) en la concentración postprandial media de fenilalanina en plasma con la ingesta de la dieta de AA (día 4) en comparación con la dieta de GMP (día 8, Figura 7).

10 El cambio medio en la concentración de fenilalanina en plasma fue de 57 ± 52  $\mu\text{mol}$  de fenilalanina/l. Entre los sujetos individuales, la respuesta de la concentración de fenilalanina en plasma a la ingesta de la dieta de GMP fue heterogénea, variando de una disminución de 175  $\mu\text{mol}$  de fenilalanina/l a un aumento de 257  $\mu\text{mol}$  de fenilalanina/l. En general, no hubo una asociación uniforme entre un cambio en la concentración de Phe en plasma con la ingesta de la dieta de AA en comparación con la dieta de GMP y el sexo, genotipo y edad.

15 Las concentraciones de fenilalanina tanto en plasma en ayunas como postprandial estaban disponibles el día 4 (dieta de AA) y el día 8 (dieta de GMP) para un subconjunto de 6 sujetos adultos. La respuesta postprandial a la dieta de GMP no fue significativamente diferente con este subconjunto ( $n = 6$ ) que con los 5 primeros sujetos. La ingesta de la dieta de AA durante 4 días resultó en un aumento significativo del 10 % en la concentración de fenilalanina en plasma obtenida después de un ayuno nocturno en comparación con la concentración de fenilalanina en plasma postprandial obtenida 2,5 h después del desayuno ( $p = 0,048$ ). Por el contrario, la ingesta de la dieta de GMP durante 4 días no produjo un cambio significativo en la concentración de fenilalanina en plasma cuando se comparó el plasma obtenido en ayunas con el plasma obtenido en un estado postprandial.

20 25 La tirosina es un AA importante en la dieta de PKU, porque es indispensable y un precursor de adrenalina, norepinefrina, melanina y tiroxina. Las concentraciones de tirosina en plasma obtenidas en las muestras postprandiales o en ayunas no fueron significativamente diferentes con la ingesta de las dietas de GMP o AA (véase la Tabla 14). Las concentraciones de tirosina en plasma después de un ayuno nocturno disminuyeron en comparación con las concentraciones postprandiales con la ingesta tanto de la dieta de GMP como de AA; sin embargo, la dieta de GMP produjo una concentración media de tirosina en ayunas que estaba por debajo del intervalo normal.

30 35 AA adicionales. El cambio más espectacular en el perfil de AA en plasma con la ingesta de GMP en comparación con la dieta de AA fue el aumento de 2,25 a 2,47 veces en las concentraciones postprandiales de isoleucina y treonina AANG no tóxicas, lo que coloca estos valores por encima del intervalo clínico normal (véase la Tabla 14). Se produjo un aumento significativo en la concentración en plasma de isoleucina y treonina con la dieta de GMP en las 24 h posteriores a la ingesta de la dieta de GMP y coincidió con las altas concentraciones de estos AA en GMP (véase la Figura 9). Sin embargo, no hubo un aumento significativo adicional en las concentraciones en plasma de isoleucina y treonina después de los días 5 y 7, respectivamente. La concentración de isoleucina no fue diferente en el plasma obtenido después de un ayuno nocturno, mientras que la concentración de treonina en el plasma en ayunas se mantuvo ~2 veces superior con la ingesta de la dieta de GMP en comparación con la dieta de AA.

40 45 De acuerdo con el perfil de AA de los compuestos dietéticos de GMP y AA, hubo concentraciones postprandiales significativamente inferiores de ornitina y triptófano en plasma y concentraciones significativamente superiores de isoleucina y treonina en plasma con el consumo de la dieta de GMP en comparación con la dieta de AA. Después de un ayuno nocturno, la concentración en plasma de arginina fue significativamente inferior y la concentración de treonina fue significativamente superior con la dieta de GMP en comparación con la dieta de AA (véase la Tabla 14).

Tabla 14: Efecto de las dietas de (AA) y glicomacropéptido (GMP) en las concentraciones en ayunas y postprandiales (PP) de los AA en plasma<sup>1</sup>

AA	Dieta de AA			Dieta de GMP			Valor <i>p</i> de la respuesta a la dieta en ayunas en comparación con PP <sup>4</sup>
	PP <sup>2</sup>	Ayunas <sup>2</sup>	Valor <i>p</i> <sup>3</sup>	PP <sup>2</sup>	Ayunas <sup>2</sup>	Valor <i>p</i> <sup>3</sup>	
μmol/l						μmol/l	
Alanina	455 ± 52	356 ± 25	0,029	514 ± 45	401 ± 50	0,001	0,743
Arginina	62 ± 14	57 ± 5	0,694	47 ± 5	47 ± 6	0,845	0,551
Citrulina	37 ± 4	26 ± 5	0,138	23 ± 3	26 ± 4	0,084	0,063
Cistina	43 ± 1	43 ± 2	0,899	37 ± 2	41 ± 3	0,019	0,062
Ácido glutámico	40 ± 8	50 ± 10	0,207	43 ± 10	49 ± 9	0,556	0,692
Glutamina	635 ± 29	628 ± 15	0,747	659 ± 33	623 ± 28	0,025	0,095
Glicina	415 ± 62	399 ± 55	0,473	346 ± 40	371 ± 47	0,099	0,112
Histidina	85 ± 9	78 ± 5	0,206	82 ± 6	75 ± 4	0,066	0,681
Isoleucina	120 ± 57 ± 49 ± 4	120 ± 49 ± 4	0,352	119 ± 15	54 ± 5	0,015	0,004
Leucina	20 ± 210 ± 96 ± 3	210 ± 96 ± 3	0,313	191 ± 86 ± 11	83 ± 4	0,823	0,264
Lisina	19	181 ± 9	0,062	24	171 ± 16	0,138	0,311
Metionina	24 ± 2	24 ± 1	0,832	31 ± 4	25 ± 3	0,150	0,144
Ornítina	74 ± 7	60 ± 8	0,004	462 ± 50 ± 4	62 ± 18	0,460	0,129
Fenilalanina	100 ± 200 ± 508 ± 95	100 ± 200 ± 508 ± 95	0,048	234 ± 106	101	0,349	0,037
Prolina	15 ± 131 ± 144 ± 12	15 ± 131 ± 144 ± 12	0,001	127 ± 37	160 ± 20	0,012	0,322
Serina	21	122 ± 16	0,123	14	120 ± 11	0,517	0,821
Taurina	73 ± 19	82 ± 18	0,154	158 ± 73 ± 13	63 ± 11	0,145	0,027
Treonina	22	135 ± 17	0,013	44	265 ± 29	0,030	0,064
Triptófano	48 ± 5	44 ± 3	0,269	34 ± 3	42 ± 2	0,048	0,006
Tirosina	81 ± 8	38 ± 3	0,001	241 ± 56 ± 10	29 ± 3	0,027	0,155
Valina	240 ± 9 ± 417 ± 9	240 ± 9 ± 417 ± 9	0,015	445 ± 21	187 ± 5	0,048	0,521
BCAA	28	347 ± 14	0,084	45	324 ± 8	0,048	0,062

<sup>1</sup>Los valores son las medias ± ETM; *n* = 6, a excepción de la cistina para la que *n* = 5. BCAA, suma de leucina, isoleucina y valina.

<sup>2</sup>Las concentraciones en plasma PP de ornitina (*p* = 0,019) y triptófano (*p* = 0,003) fueron significativamente inferiores, pero en el intervalo normal, y la isoleucina (*p* = 0,003) y la treonina (*p* = 0,004) fueron significativamente superiores con la ingesta de la dieta de GMP que con la dieta de AA y por encima del intervalo normal. Las únicas diferencias significativas en las concentraciones de AA en ayunas fueron una disminución en la arginina (*p* = 0,008) y un aumento en la treonina (*p* = 0,001) con la ingesta de la dieta de GMP en comparación con la dieta de AA.

<sup>3</sup>Hubo un efecto significativo del tiempo en el ANOVA de medidas repetidas. El análisis estadístico mediante la prueba t pareada, emparejamiento en el sujeto procede de los datos recogidos el último día de la dieta de AA (día 4) y el último día de la dieta de GMP (día 8).

<sup>4</sup>La respuesta a una dieta se calcula primero encontrando la diferencia entre las concentraciones de AA en ayunas y PP para cada sujeto en la dieta de AA y en la dieta de GMP, y luego comparando las diferencias mediante la prueba t pareada, emparejamiento en el sujeto.

Este es el primer ensayo clínico para investigar la eficacia de la sustitución de las fórmulas de AA sintéticas que

- actualmente se requieren para el tratamiento nutricional de la PKU por la proteína intacta de productos alimentarios de GMP. No se encontraron problemas de salud adversos, y la química sanguínea se mantuvo normal cuando los sujetos con PKU consumieron GMP como su principal fuente de proteínas durante 4 días en este estudio de dieta metabólica controlada (Tabla 13). Además, los productos de GMP fueron preferidos por los sujetos, lo que confirma los resultados de las pruebas de sabor con ocultación que comparan los productos de GMP con los productos de AA en aquellos con PKU (véase el Ejemplo 2). Por lo tanto, los alimentos y las bebidas elaborados con GMP son seguros y altamente aceptables para su uso en la dieta restringida en fenilalanina para la PKU.
- Durante un período de 4 días, no hubo ningún cambio significativo en las concentraciones de fenilalanina en plasma con la ingesta de productos de GMP en comparación con la fórmula de AA (Figura 7). El GMP, como fuente de proteína intacta, puede retrasar la absorción de los AA y mejorar la utilización de la fenilalanina y otros AA para la síntesis de proteínas en comparación con una fuente de AA sintética. En este estudio, la dieta de AA mostró una concentración de fenilalanina media en ayunas significativamente mayor en comparación con la concentración de fenilalanina postprandial (Figura 8), mientras que no hubo diferencias significativas en las concentraciones de fenilalanina en ayunas y postprandiales aparentes con la dieta de GMP (Tabla 14). Esto sugiere que la dieta de GMP indujo una menor variación y concentraciones medias potencialmente inferiores de fenilalanina en el plasma durante un período de 24 horas. Esto coincide con una mayor retención de proteínas y una menor oxidación de los AA en asociación con una menor velocidad de absorción de AA cuando la fuente de proteína de la dieta es una proteína intacta, tal como GMP, en comparación con una fuente de AA libre, tal como la fórmula de AA.
- Las pruebas de retención mejorada de proteína con la dieta de GMP también se demostró mediante una menor concentración de BUN en suero, y mayores concentraciones de insulina y de AA totales en plasma cuando se midieron 2,5 h después de tomarse un desayuno que contenía GMP en comparación con uno que contenía AA (Tabla 13, Figura 6). La urea se produce linealmente en respuesta a las concentraciones en plasma de AA, y el control del equilibrio de nitrógeno está regulado principalmente por la producción de urea. Cabría esperar que el BUN, como medida de la utilización hepática de los AA para la síntesis de la urea, permaneciera más bajo con una liberación de AA esplácnica más lenta. Por lo tanto, una elevación más lenta, gradual y sostenida de la concentración en plasma de AA con una fuente de proteína intacta, junto con una menor concentración de BUN, sugiere que se degradan menos AA para la producción de urea y, en cambio, se retienen para la síntesis de proteínas cuando se sustituyen los AA por el GMP como la principal fuente de proteína.
- Se sabe que los AA postabsorbentes, que incluyen isoleucina y treonina (Calbet *et al.*, *J Nutr* 2002; 132: 2174-82) estimulan la liberación de insulina con la posterior estimulación de la síntesis de proteínas y la inhibición de la degradación de proteínas (Schmid, *et al.*, *Pancreas* 1992; 7:698-704). Debido a que el GMP induce una liberación más lenta y prolongada de los aminoácidos, se pueden potenciar la respuesta de insulina y el estímulo de la síntesis neta de proteínas. Además, se ha demostrado que la proteína del suero de la leche aumenta la concentración de insulina en mayor medida que otras fracciones de proteína láctea u otras fuentes de proteínas intactas (Nilsson *et al.*, *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1246-53). Por lo tanto, la capacidad de GMP para ralentizar el catabolismo de los AA y la ureagénesis puede reflejar el aumento de las concentraciones postprandiales de treonina e isoleucina que actúan como secretores de insulina, así como la absorción retardada de AA.
- Para este estudio, se complementó el GMP con los 5 siguientes AA limitantes según las recomendaciones de ADR de 2002: histidina, leucina, metionina, triptófano y tirosina. Las concentraciones en plasma de histidina, leucina y triptófano se mantuvieron dentro del intervalo normal, lo que sugiere una complementación adecuada de estos AA en la dieta de GMP (Tabla 14). Por el contrario, la concentración en plasma de tirosina estaba por debajo del intervalo normal cuando se midió en ayunas (Tabla 14), lo que sugiere que se puede necesitar complementación con tirosina adicional en el GMP. De hecho, la tirosina adicional de un complemento que proporciona 1000 mg/día permitió que las concentraciones de tirosina en plasma permanecieran dentro del intervalo normal para un sujeto que consumió GMP como su principal fuente de proteínas durante 10 semanas (véase el Ejemplo 3). En resumen, nuestros datos sugieren que el GMP debe complementarse con arginina, histidina, leucina, triptófano y tirosina para proporcionar una fuente completa de proteína dietética en la dieta de PKU.
- La adherencia de por vida a la dieta de PKU es muy difícil, dando lugar a menudo a un mal cumplimiento y las consecuencias neuropsicológicas de la hiperfenilalaninemia. Esta investigación muestra un paradigma nuevo y mejorado para la dieta de PKU mediante el uso de alimentos y bebidas apetecibles elaborados con la proteína intacta, baja en fenilalanina GMP en lugar de AA sintéticos. Cuando se complementa con los AA indispensables limitantes, el GMP parece ser una alternativa segura y aceptable a los AA sintéticos como la principal fuente de proteínas para el tratamiento nutricional de la PKU. Como proteína intacta, el GMP retrasa la absorción de los AA y mejora la retención de proteínas y la utilización de la fenilalanina en comparación con una dieta que proporciona la mayoría del nitrógeno de los AA.
- Ejemplo 5: Aumento de la pureza de GMP y uso de un cálculo de equilibrio de masas para la complementación con aminoácidos de alimentos a base de GMP**
- Este ejemplo ilustra métodos de aumento de la pureza del GMP usado en la preparación de alimentos a base de GMP. Además, el ejemplo ilustra el uso de un cálculo de equilibrio de masas para determinar el grado de

complementación de los aminoácidos indispensables de alimentos a base de GMP.

#### Introducción

- 5 Las asignaciones diarias recomendadas (ADR) de aminoácidos indispensables para individuos mayores de 1 año se han establecido basándose en el contenido de nitrógeno de los alimentos (véase la Tabla 15).

10 Tabla 15: Asignación diaria recomendada (ADR) de aminoácidos indispensables para niños  $\geq 1$  año y todos los demás grupos de edad. (Adaptado de Inst. of Medicine 2005, Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids, Washington, DC: Natl. Academies Press).

Aminoácido	ADR en mg/g de N	ADR en mg/g de EP <sup>a</sup>
His	114	18
Ile	156	25
Leu	341	55
Lys	320	51
Met + Cys	156	25
Phe + Tyr <sup>b</sup>	291	47
Thr	170	27
Trp	43	7
Val	199	32

<sup>a</sup>EP = N x 6,25.  
<sup>b</sup>Solo se usó Tyr para complementar GMP.

- 15 Los valores de ADR para los aminoácidos se suelen presentar en equivalentes de proteína (EP) definidos como el nitrógeno total (N) multiplicado por un factor de conversión de 6,25 (Inst. of Medicine 2005). La mayoría de las proteínas contienen aproximadamente el 16 % de nitrógeno y es apropiado un factor de conversión de 6,25 (100 g de proteína/16 g de N = 6,25 g de proteína/g) (Nielsen SS 2003, Food Analysis, 3<sup>a</sup> ed. Nueva York: Kluwer Academic/Plenum Publishers). Sin embargo, el factor de conversión de nitrógeno a proteína varía entre los alimentos. Por ejemplo, el factor de conversión de nitrógeno a proteína usado para la mayoría de las proteínas lácteas es de 6,38 (Id). El GMP es un péptido heterogéneo, algunas moléculas de GMP están glicosiladas y otras no. Debido a esto, el factor de conversión para una molécula de GMP puede variar de 6,70 a 9,55 dependiendo del grado de glicosilación presente (Dziuba y Minkiewicz 1996, *Int Dairy J* 6(11-2):1017-44). La ambigüedad en la definición de masa proteica se ilustra por un fabricante de GMP que usa un factor de conversión de 6,47 para informar sobre la proteína y de 7,07 para informar sobre el GMP (Davisco Foods Intl.).
- 20 25 El contenido de proteína real de los alimentos es difícil de medir cuando los factores de conversión exactos de nitrógeno a proteína son desconocidos. Las proteínas pueden contener nitrógeno no proteico o aminoácidos básicos, que son superiores en nitrógeno que otros aminoácidos. Para que GMP proporcione los niveles recomendados de aminoácidos indispensables en la dieta, se debe conocer la composición de proteínas de los alimentos consumidos usando una definición inequívoca de lo que constituye 1 g de proteína. En este ejemplo, se usó un factor de conversión de 6,25 para cumplir con la definición de proteína usada en el Inst of Medicine (Inst. Of Medicine, 2005) para establecer la ADR para los aminoácidos indispensables para individuos mayores de 1 año (véase la Tabla 15).
- 30 35 Las tecnologías actuales a gran escala para aislar el GMP del suero de la leche usan la cromatografía de intercambio iónico o la ultrafiltración. El GMP tiene un punto isoeléctrico (pI) por debajo de 3,8, mientras que otras proteínas principales del suero tienen valores de pI superiores a 4,3. Esta diferencia fisicoquímica entre el GMP y otras proteínas del suero de la leche se usa comúnmente en procesos de aislamiento para separar el GMP del suero de la leche. El GMP disponible en el mercado aislado por cromatografía de intercambio iónico normalmente no es lo suficientemente puro para los alimentos de PKU, porque contiene demasiada Phe de proteínas de suero de la leche residuales (es decir, 5 mg de Phe/g de producto, literatura del fabricante, Davisco Foods Intl., Eden Prairie, Minnesota, EE.UU.). La fórmula tradicional de aminoácidos está exenta de Phe, que permite a un individuo con PKU consumir alimentos naturales que contienen Phe para cubrir su asignación diaria. Para que el GMP sea un reemplazo de proteína factible para la fórmula de aminoácidos en la dieta de PKU, se necesitan mejores procesos para aumentar la pureza del GMP y reducir el contenido de Phe.
- 40 45 50 Para llevar a cabo un ensayo clínico en seres humanos destinado a probar la seguridad y la viabilidad de alimentos de GMP para individuos con PKU, se desarrolló un proceso a escala piloto para preparar GMP altamente purificado suficiente para alimentar a 15 individuos durante 4 días. Se usaron materiales de grado alimentario e instalaciones aprobadas para alimentos para fabricar 5 kg de GMP purificado usando las siguientes operaciones unitarias por orden (1) cromatografía de intercambio catiónico, (2) ultrafiltración y diafiltración (UF/DF) y (3) liofilización. Además,

se desarrolló un cálculo del equilibrio de masas para proporcionar una base claramente definida para la administración de complementos de aminoácidos. Se usó GMP purificado y complementado para preparar alimentos de GMP consumidos en el ensayo clínico en seres humanos.

## 5 Materiales y métodos

Este apartado se ha dividido en 3 subapartados: (1) operaciones unitarias usadas para fabricar GMP purificado usando materiales de grado alimentario; (2) cálculos de equilibrio de masas usados para determinar la recuperación de GMP y la masa de aminoácidos para la complementación de GMP purificado; y (3) preparación y análisis de un alimento de GMP consumido en el ensayo clínico y la respuesta de 1 paciente.

### Proceso de purificación del GMP

Se atraparon proteínas del suero de la leche contaminadas en GMP en bruto (BioPure GMP, Davisco Foods Intl.) mediante adsorción sobre una resina de intercambio catiónico y se recogió GMP en la fracción de flujo continuo. Se usó ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) para concentrar el GMP y separar por lavado los péptidos, las sales y el nitrógeno no proteico. Se usó la liofilización para secar el GMP concentrado purificado.

*Cromatografía de intercambio catiónico.* Se rellenó una columna de cromatografía de 20 cm de diámetro (INdEX, GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.) con perlas SP Sepharose Big Beads (GE Healthcare). El volumen de la columna (VC) fue de 5,34 l, y la altura del lecho fue de 18 cm.

Se preparó la solución de alimentación (75 g/l) mezclando GMP en bruto (BioPure GMP, Davisco Foods Intl.) con lactato de sodio 10 mM, pH 4, y filtrando a través de un filtro de tamaño de poro de 0,45 µm (Sartobran P, Sartorius, Edgewood, NY, EE. UU.). Los tampones de equilibrio y elución eran lactato de sodio 50 mM de calidad alimentaria, pH 4 y NaOH 10 mM, pH 12, respectivamente. El tampón de equilibrado y la solución de alimentación de GMP se mantuvieron a 4 °C para inhibir el crecimiento microbiano. El tampón de elución se mantuvo a 22 °C. El caudal fue de 950 ml/min. Cada ciclo de intercambio catiónico consistió en 4 etapas: (1) se llevó la columna a pH 4 usando 2 VC de tampón de equilibrado; (2) se aplicaron 0,5 VC de solución de alimentación a la columna; (3) la columna se enjuagó con tampón de equilibrado, desecharon los primeros 0,3 VC de efluente (volumen muerto de columna) y los 2 VC siguientes de GMP purificado se recogieron; y (4) las proteínas unidas se desorbieron de la columna usando 2,5 VC de tampón de elución. Cada una de las 5 campañas consistió en 9 de 11 ciclos consecutivos. Se generaron aproximadamente 100 l de solución de proteína GMP diluida de cada campaña. La columna de intercambio catiónico se limpió bombeando en NaOH 0,2 M, manteniéndose durante 1 h, y luego almacenándose la columna en NaOH 10 mM.

*Ultrafiltración y diafiltración.* Se ajustó el efluente de GMP del intercambiador catiónico a pH 7 mediante la adición de NaOH 1 M, y se concentró a 60 °C usando una membrana de ultrafiltración de fibra hueca (3 kDa, 3,3 m<sub>2</sub>, UFP-3-C-55, GE Healthcare). La presión aplicada fue de 140 kPa (1,4 bar). La solución de GMP se concentró de 100 a 10 l, luego se añadieron 20 l de agua destilada y se concentró la solución nuevamente a 10 l. El concentrado se filtró usando un filtro de tamaño de poro de 0,45 µm (Sartorius) en un recipiente desinfectado y se almacenó en 4°C. Antes y después de cada uso, se limpió la membrana de UF durante 30 minutos usando NaOH 0,2 M que contenía 100 ppm de NaOCl (blanqueador) a 50 °C. La membrana de UF se almacenó en NaOCl 10 ppm.

*Liofilización.* Se congeló la solución de GMP estéril filtrada y concentrada en una capa fina en matraces de vidrio de liofilización de 1,2 o 2 l y se secó durante 48 h (Lyphlock6, Labconco, Kansas City, MO, EE.UU.). Se recogió el polvo de GMP, se pesó y se usó una porción para el análisis.

*Análisis de la composición.* El laboratorio Experiment Station Chemical Laboratories (Univ. de Missouri-Columbia, Columbia, MO, EE. UU.) realizó el análisis de proteínas en bruto (CP) y el perfil completo de aminoácidos (AAP). Se usó el método oficial AOAC 982.30 para el AAP y el método oficial 990.03 de AOAC para CP ([AOAC] Assn. of Official Analytical Chemists, Intl. 2005. Official methods of analysis of official analytical chemists. 18<sup>a</sup> ed. Gaithersburg, Md.: AOAC). Los resultados se presentaron en gramos por 100 g de peso seco de GMP purificado. Se usó un factor de conversión de 6,25 veces el nitrógeno total para expresar los resultados en EP. Se realizaron análisis por duplicado para todas las muestras.

### Cálculos de equilibrio de masas

Los cálculos de equilibrio de masas se presentan para describir (1) los cálculos usados para determinar la recuperación de GMP del proceso de fabricación; (2) la base de lisina usada para la administración de complementos de aminoácidos; y (3) el método usado para determinar la cantidad necesaria de aminoácidos complementarios.

*Recuperación de GMP.* La recuperación se calculó en EP. Se determinaron los gramos de EP en la solución suministrada ( $M_{EP, \text{suministrada}}$ ) multiplicando la concentración en la alimentación de GMP (75 g/l) por los gramos de EP por gramo de polvo (del análisis CP) y luego multiplicando por el volumen total de la solución de alimentación

procesada. Los gramos totales de EP recuperados ( $M_{EP, recuperada}$ ) se obtuvieron multiplicando la masa de polvo de GMP purificado por los gramos de EP por gramo de GMP purificado (del análisis CP). La recuperación de GMP (%) fue igual a  $M_{EP, recuperada}/M_{EP, suministrada} \times 100$ .

- 5    *Base de lisina para la complementación de aminoácidos.* Se requiere la administración de complementos de aminoácidos para que el GMP purificado cumpla con los objetivos nutricionales establecidos por la ADR y el ensayo clínico. Se escogió la lisina (Lys) como la base para el cálculo de la complementación del equilibrio de masas, porque estaba más cerca del valor diana (véase la Tabla 16, columna C en comparación con D). Solo 5 aminoácidos indispensables para la PKU requieren complementos: His, Leu, Met, Trp y Tyr. Los aminoácidos prescindibles y condicionalmente indispensables no se complementaron.
- 10

Los aminoácidos libres se absorben y degradan más rápidamente que los proporcionados por las proteínas intactas. Por lo tanto, la composición de aminoácidos diana para el ensayo clínico se estableció por encima de los niveles de ADR. Los objetivos para His, Leu, Met y Trp se establecieron en el 130 % del nivel de ADR. Tyr se complementó al 150 % del nivel de ADR, porque las fórmulas de aminoácidos suelen estar enriquecidas con altos niveles de Tyr. En las tablas y figuras relacionadas con la complementación de GMP para cumplir con la ADR, Phe y Tyr se enumeran juntos, al igual que Met y Cys, porque Tyr y Cys son aminoácidos condicionalmente prescindibles que se pueden sintetizar a partir de Phe y Met, respectivamente. Sin embargo, en un paciente con PKU, Tyr no se puede sintetizar a partir de Phe.

20

Tabla 16: Método de cálculo de aminoácidos (AA) complementarios

Aminoácido	Composición de AA del GMP <sup>A</sup> mg/g de GMP purificado	EP de GMP <sup>A</sup> g EP/g GMP purificado	Composición de GMP en EP mg/g de EP	Valor diana del ensayo clínico mg/g de EP	E = D - C		F = C + E	G
					D	Ignora los EP de los AA añadidos (no incluidos en el denominador)	Composición complementaria con AA necesaria mg/g de EP	Incluye los EP de los AA añadidos (incluidos en el denominador)
His	1,15 ± 0,07	-	1,5 ± 0,1	23	22	23,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	-	21 ± 2 <sup>a</sup>
Ile	75,5 ± 4,2	-	102 ± 2	25	0	102 ± 2 <sup>a</sup>	-	90 ± 10 <sup>a</sup>
Leu	17 ± 1	-	23 ± 0,2	72	49	72 ± 0,2 <sup>a</sup>	-	66 ± 7a
Lys	44 ± 3	-	60,1 ± 0,8	51	0	60,1 ± 0,8 <sup>a</sup>	-	55 ± 6 <sup>a</sup>
Met +								
Cys	15 ± 2	-	20,5 ± 0,5	33	12	32,5 ± 0,8 <sup>a</sup>	-	30 ± 3 <sup>a</sup>
Phe +								
Tyr	3 ± 1	-	2,6 ± 0,6	71	68	70,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	-	64 ± 6 <sup>a</sup>
Thr	120 ± 10	-	161 ± 2	27	0	161 ± 2 <sup>a</sup>	-	150 ± 10 <sup>a</sup>
Trp	0 ± 0	-	0 ± 0	9	9	9 ± 0 <sup>a</sup>	-	8 ± 0,8 <sup>a</sup>
Val	62 ± 3	-	85 ± 2	32	0	85 ± 2 <sup>a</sup>	-	78 ± 8 <sup>a</sup>
EP								
							0,81 ± 0,06	

<sup>A</sup>Composición obtenida mediante análisis. Los valores son la media ± DT. El tamaño de la muestra era de n= 2.  
Las mismas letras en la columna F y H indican que no hay diferencia estadística significativa ( $p > 0,05$ ).

- Cálculos de la complementación con aminoácidos.** Un desafío con la complementación es que la adición de aminoácidos al GMP purificado cambia el objetivo de aminoácidos (mg de aminoácidos/g de EP) cambiando tanto el numerador (mg de aminoácidos) como el denominador (g de EP). Se ilustrarán dos métodos para el cálculo de la complementación: uno incluye el cambio en el denominador y el otro no. Ambos métodos explican el cambio en el numerador. Las etapas usadas para calcular la complementación de aminoácidos se presentan en la Tabla 16 anterior. Se usaron los resultados experimentales para AAP para obtener el miligramo de cada aminoácido por gramo de GMP purificado (columna A). Los resultados experimentales para CP (columna B) se dividieron en la columna A para obtener la composición de aminoácidos de GMP en EP (columna C). Se necesitó la conversión a EP (columna C) para comparar la composición de aminoácidos del GMP purificado con los valores diana del ensayo clínico (columna D). Los valores de aminoácidos del GMP purificado se restaron de cada uno de los valores diana del ensayo clínico para producir la masa necesaria de cada aminoácido complementado (columna E). Sumando los valores de aminoácidos requeridos (columna E) a los valores de aminoácidos de GMP purificado (columna C), se calculó la composición del GMP complementado (columna F). Este método para el cálculo de la complementación ignoró el impacto de añadir los aminoácidos en el denominador de la composición de aminoácidos (mg/g de EP).
- Para explicar el cambio en el denominador, se debe tener en cuenta el aumento en los gramos de EP por gramo de GMP purificado debido a la complementación (Tabla 16, columnas G y H). Para ello, se determinó la contribución total de nitrógeno de los aminoácidos complementarios necesarios para 1 g de GMP purificado a partir de la fórmula molecular y se multiplicó por 6,25, proporcionando los gramos totales de EP aportados por los aminoácidos añadidos. Los gramos de EP de los aminoácidos complementados se añadieron a los gramos de EP por 1 g de GMP purificado (columna B), proporcionando los gramos corregidos de EP por gramo de GMP purificado (columna G). La composición complementada (columna F) se multiplicó por la columna B y se dividió entre la columna G para explicar el cambio en el denominador (columna H).
- La composición de GMP complementado corregida no fue estadísticamente significativamente diferente de la composición sin corregir (Tabla 16, columna H en comparación con F) ( $p > 0,05$ ). Por lo tanto, el método de cálculo usado para complementar el GMP purificado en este estudio supone que la contribución de los aminoácidos añadidos al denominador fue insignificante.
- Preparación y análisis de alimentos de GMP.** La receta para el pudín de fresa con GMP se presenta en la Tabla 17. El GMP purificado, los aminoácidos complementarios y la crema no láctea (Flavorite Non-Dairy Creamer, SuperValu, Eden Prairie, Minnesota, EE. UU.) aportaron aminoácidos al pudín de fresa de GMP. La aportación de aminoácidos del GMP purificado, la crema no láctea y los aminoácidos añadidos se usaron para calcular la composición de aminoácidos del pudín en EP usando el método presentado previamente en la Tabla 16.

35

Tabla 17: Receta de pudín de fresa con GMP

Ingredientes	Porcentaje % de mezcla en seco (p/p)
GMP purificado <sup>a</sup>	12,94
Aminoácidos complementados <sup>a</sup>	
His	0,22
Leu	0,70
Met	0,11
Tyr	0,68
Trp	0,09
Ingredientes alimentarios	
Crema no láctea <sup>a</sup>	39,73
Sacarosa	32,22
Almidón	8,60
Fresas, desecadas	2,13
Ácido cítrico	1,59
Cloruro de sodio	0,57
Aroma de fresa	0,41
Colorante rojo	0,01
Mezcla en seco total	100

<sup>a</sup>El GMP purificado, aminoácidos complementarios y crema no láctea aportan aminoácidos al producto final.

**Análisis estadístico.** El análisis estadístico se realizó usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) (Minitab

Statistical Software, Versión 13.32, State College, Pa., EE. UU.) Para comparar la composición de GMP complementado con y sin tener en cuenta el denominador (Tabla 16). Se construyeron intervalos de confianza para comparar la composición calculada del pudín de fresa de GMP con la composición observada y los valores de ADR. Se usó un nivel de confianza del 95 % para construir intervalos de confianza, y se declaró la significación estadística a  $\alpha < 0,05$ .

## 5 Resultados

El objetivo de este estudio era producir GMP purificado con Phe reducida en cantidades lo suficientemente elevadas como para suministrar a 15 sujetos con PKU alimentos de GMP durante su participación en un ensayo clínico de 8 días. El GMP purificado requirió una complementación con aminoácidos limitantes indispensables para proporcionar una fuente de proteína nutricionalmente completa para su uso en alimentos de GMP. Se probó la seguridad y eficacia de los alimentos de GMP como una fuente de proteína apetecible para la dieta para la PKU. Los siguientes apartados tratan cómo se cumplieron estos objetivos, y se han separado en el efecto del proceso de la planta piloto

15 sobre la recuperación y el contenido de Phe del GMP purificado, el equilibrio de masas en aminoácidos en el pudín de fresa de GMP y la comparación de la composición de aminoácidos del pudín de fresa de GMP con la ADR y una fórmula de aminoácidos, y el efecto de los alimentos de GMP complementados y purificados en los niveles en plasma de aminoácidos de los sujetos con PKU.

20 *Efecto del proceso de purificación en el contenido de Phe y en la recuperación de GMP.* La Tabla 18 contiene el contenido de Phe, la recuperación y el número de ciclos de intercambio catiónico para cada campaña. La Phe en el GMP en bruto se redujo en un 47 % mediante el proceso de purificación, de  $4,7 \pm 0,5$  mg/g de EP a  $2,7 \pm 0,4$  mg/g de EP. La recuperación media de GMP fue del  $52 \pm 4$  %. La baja recuperación de GMP se atribuyó principalmente a una porción de GMP que se unió a la columna de intercambio catiónico y no se recuperó en la fracción de flujo continuo. El proceso de purificación usado para aumentar la pureza de GMP disponible en el mercado dio concentraciones de Phe uniformes y repetibles, y no hubo diferencias estadísticas entre las concentraciones de Phe en el GMP purificado producido por las 5 campañas ( $p > 0,05$ ).

25 Tabla 18: Contenido de Phe del GMP purificado y disponible en el mercado

Campaña	Ciclos	Phe <sup>a</sup> mg/g EP	% recuperación de GMP
1	10	$3,3 \pm 0,2$	51
2	11	$2,6 \pm 0,2$	55
3	10	$3 \pm 0$	55
4	9	$2,2 \pm 0,5$	53
5	9	$2,7 \pm 0,1$	44
GMP purificado medio	--	$2,7 \pm 0,4$	$52 \pm 4$
GMP disponible en el mercado	--	$4,7 \pm 0,5$	--

<sup>a</sup>Composición obtenida mediante análisis. Los valores son la media  $\pm$  DT. El tamaño de la muestra fue n = 2.

30 La transmisión de GMP a través de la membrana de UF para cada campaña se presenta en la Tabla 19. En general, la retención de GMP por la membrana de UF fue del  $96 \pm 2$  %. Aunque el GMP tiene un peso molecular de aproximadamente 7 kDa, tiene un peso molecular aparente de 45 kDa a pH 4 y superior. El pH de la solución de GMP se aumentó a 7 para la etapa de UF/DF para reducir al mínimo la transmisión de GMP a través de la membrana de 3 kDa. Esto probablemente explica la alta recuperación encontrada para la etapa de UF.

35 Tabla 19: Transmisión de GMP a través de la membrana de UF

Campaña de GMP	Transmisión de GMP (%)
1	3,4
2	6,8
3	2
4	3,6
5	2
DT media (n = 5)	$4 \pm 2$

40 *Comparación de los cálculos de complementación de aminoácidos y la composición de los alimentos de GMP.* Se analizó el pudín de fresa con GMP y se comparó la composición con la composición de aminoácidos calculada (Tabla 20). Se complementó el GMP purificado (Tabla 20, columna A) con aminoácidos (columna B), determinados mediante el método del equilibrio de masas que ignoraba el cambio en el denominador debido a los aminoácidos añadidos; de manera similar para los aminoácidos añadidos de la crema no láctea (columna C). La suma de las columnas A, B y C fue la composición calculada del pudín de GMP ignorando los cambios en el denominador (columna D).

Tabla 20: Composición de aminoácidos (AA) calculada y analizada del pudín de fresa con GMP

Aminoácido	A	B	C	D = A + B + C	E	F
	GMP purificado <sup>A</sup> mg/g EP de GMP	AA añadidos de aminoácidos complementados <sup>B</sup> mg/g EP de GMP	AA añadidos de crema no láctea <sup>A</sup> mg/g EP de GMP	(AA añadidos no incluidos en el denominador)	Composición de AA calculada <sup>B</sup> mg/g EP de GMP	Composición de AA analizada <sup>A</sup> mg/g EP total
His	1,5 ± 0,1	22	2,9 ± 0,6	26,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	21 ± 3 <sup>a</sup>	18 ± 3 <sup>a</sup>
Ile	102 ± 2	0	5,6 ± 0,5	108 ± 2 <sup>a</sup>	83 ± 7 <sup>a,b</sup>	70 ± 10 <sup>b</sup>
Leu	23 ± 0,2 60,1 ±	69	10 ± 1	102 ± 1 <sup>a</sup>	81 ± 6 <sup>b</sup>	77 ± 2 <sup>b</sup>
Lys	0,8	0	6 ± 1	66 ± 1 <sup>a</sup>	51 ± 5 <sup>a,b</sup>	47 ± 8 <sup>b</sup>
Met +	20,5 ±					
Cys	0,5	11	4 ± 1	36 ± 1 <sup>a</sup>	28 ± 2 <sup>b</sup>	22 ± 3 <sup>b</sup>
Phe +						
Tyr	2,6 ± 0,6	66	8,7 ± 0,7	70,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	63 ± 4 <sup>b</sup>	45 ± 3 <sup>c</sup>
Thr	161 ± 2	0	4,1 ± 0,7	165 ± 2 <sup>a</sup>	130 ± 10 <sup>a</sup>	120 ± 30 <sup>a</sup>
Trp	0 ± 0	9	1,7 ± 0,1	10,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	8,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	10 ± 2 <sup>a</sup>
Val	85 ± 2	0	7 ± 1	91 ± 3 <sup>a</sup>	70 ± 6 <sup>a,b</sup>	70 ± 10 <sup>b</sup>

<sup>A</sup>Composición obtenida mediante análisis. Los valores son la media ± DT. El tamaño de la muestra fue n = 2.<sup>B</sup>Calculado sin incluir los aminoácidos añadidos en el denominador (Método de la Tabla 2, columna F).<sup>C</sup>Calculado incluyendo los aminoácidos añadidos en el denominador (Método de la Tabla 2, columna H). La misma letra entre las columnas D, E y F indica que no se detectó diferencia entre las medias ( $p > 0,05$ ). Se detectó una diferencia estadísticamente significativa entre las columnas E y F para Tyr + Phe a  $\alpha < 0,05$ , pero no a  $\alpha < 0,01$ .

A modo comparativo, se calculó la composición de aminoácidos del pudín de fresa con GMP para incluir los cambios en el denominador (Tabla 20, columna E). El hecho de ignorar la contribución al denominador produjo una sobreestimación del 30 %, como media, de la composición de aminoácidos calculada en comparación con los valores observados (Tabla 20, columna D en comparación con F). Al incluir la contribución al denominador, la composición de aminoácidos calculada corregida no fue estadísticamente diferente de la composición observada ( $p > 0,05$ ), excepto para Tyr ( $p > 0,05$ ) (Tabla 20, columna E comparada con F). La composición de aminoácidos observada del pudín de fresa con GMP (columna F) cumplió o superó todos los valores diana de ADR (Tabla 15).

Se comparó la composición de aminoácidos del pudín de fresa con GMP con una fórmula de aminoácidos (véase la Figura 10). La fórmula de aminoácidos contenía significativamente más His, Leu, Met + Cys, Tyr y Trp que el pudín de fresa con GMP ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, tanto la fórmula de aminoácidos como el pudín de fresa con GMP cumplieron o superaron los objetivos de ADR para todos los aminoácidos indispensables ( $p > 0,05$ , Tabla 15).

## 15 Discusión

20 *Fabricación de GMP purificado.* La baja recuperación global de GMP ( $52 \pm 4\%$ ) se atribuyó a interacciones entre el GMP y la columna de intercambio catiónico, y dio lugar a una porción de GMP de unión a la columna. La unión de GMP a la columna se atribuyó a la heterogeneidad de GMP.. Algunas moléculas de GMP estaban menos cargadas negativamente que otras al pH operativo de 4 y, por lo tanto, se unieron a la columna de intercambio catiónico. El funcionamiento a un pH más alto puede haber reducido al mínimo la unión de GMP a la columna aumentando la carga negativa en GMP. Esto también causaría una disminución en la atracción electrostática entre las proteínas de suero de la leche residuales y la columna de intercambio catiónico, ya que la carga positiva en estas proteínas disminuiría. El aumento del pH operativo a más de 4 habría comprometido la pureza. La pureza fue una prioridad frente a la recuperación en la producción de GMP usado en el ensayo clínico.

25 La UF/DF eliminó los solutos de bajo peso molecular y concentró el GMP antes de la etapa de secado final. La UF/DF no puede eliminar las proteínas de suero de la leche contaminantes, tales como ALA y BLG, porque estas proteínas son demasiado grandes para atravesar una membrana de 3 kDa. Por otro lado, los solutos de bajo peso molecular, tales como los péptidos del suero de leche, son lo suficientemente pequeños para ser eliminados por UF/DF y pueden contener Phe.

30 La liofilización produjo un polvo blanco fino sin sabor ni olor, y se disolvió claramente en agua (datos no mostrados). Sin embargo, la desventaja de este método de secado fue el largo tiempo de procesamiento. Cada etapa del

proceso podría completarse en 1 día, pero la liofilización tardó varios días en completarse. A pesar de la necesidad de un tiempo intensivo, la liofilización fue la opción más práctica para secar el GMP purificado para su uso en este estudio. El secado por pulverización no se usó debido a las pérdidas potenciales de GMP y a las limitaciones del método al secar pequeñas cantidades de producto. En la fabricación a gran escala, el secado por pulverización sería el método de elección.

**5 Complementación de aminoácidos del GMP fabricado.** El método de cálculo usado para la complementación de GMP ignoró los gramos de EP de los aminoácidos añadidos en el denominador, pero se implementó fácilmente y produjo un pudín de fresa con GMP que cumplía o superaba los objetivos de ADR para todos los aminoácidos indispensables (Tabla 20). Para el GMP solo, el hecho de ignorar el cambio al denominador de los aminoácidos añadidos no produjo una composición de GMP diferente estadísticamente significativa (Tabla 16, columna F en comparación con H).

**10** El hecho de ignorar el cambio en el denominador de la adición tanto de la crema no láctea como de los aminoácidos complementados produjo una sobreestimación del 30 % de los aminoácidos en comparación con el valor observado, y 6 de los 9 aminoácidos fueron estadísticamente significativamente inferiores al valor observado (Tabla 20, columna D en comparación con F). Por otro lado, cuando se contabilizaron los EP aportados por los aminoácidos añadidos en el denominador, los valores calculados corregidos coincidieron con los valores observados ( $p > 0,05$ ), a excepción de Tyr ( $p < 0,05$ ) (Tabla 20, columna E en comparación con F). Sin embargo, Tyr no fue estadísticamente significativamente diferente del valor observado a  $\alpha < 0,01$  ( $p > 0,01$ ). El valor de Tyr inferior al esperado se atribuyó a la baja pureza del complemento de Tyr. La fotodegradación de Tyr puede ocurrir y podría haber tenido lugar en algún momento durante la fabricación o el almacenamiento, lo que conduciría a una pureza inferior a la esperada. Aunque el ADR para Tyr se cumplió en los alimentos de GMP, el aumento de la complementación de Tyr proporcionaría un mayor nivel de Tyr.

**15** Las simplificaciones fueron razonables para los cálculos de complementación para GMP solo, debido al impacto insignificante en la composición de aminoácidos y a la facilidad de implementación, pero no fueron razonables al realizar los cálculos de equilibrio de masas en los alimentos de GMP. El GMP más los aminoácidos complementados constituyeron el 15 % (p/p) del pudín de GMP, mientras que la crema no láctea constituía casi el 40 % (p/p) del pudín, teniendo un impacto significativo en la composición final.

A pesar de que las necesidades nutricionales de los aminoácidos no son un objeto estático, el método de cálculo del equilibrio de masas del presente estudio es genéricamente útil para complementar los alimentos de GMP con el fin de cumplir o superar las necesidades nutricionales de la dieta humana basada en la ciencia más reciente.

#### **35 Ejemplo 6: Aceptabilidad de los alimentos de GMP de la invención en comparación con la fórmula a base de AA**

**40** En este ejemplo, los inventores realizaron estudios sensoriales para comparar la aceptabilidad de Bettermilk™, un alimento medicinal de la presente invención fabricado por Cambrooke Foods, LLC, Ayer, Massachusetts, a Phenex-2™, una fórmula de aminoácidos convencional para las dietas para la PKU, producida por Abbott Nutrition, Columbus, Ohio. Bettermilk™ contiene GMP y cantidades complementadas de los aminoácidos arginina, leucina, tirosina, triptófano e histidina. Ambas fórmulas se complementaron con vitaminas y minerales para proporcionar alimentos medicinales nutricionalmente completos. Los resultados indican que Bettermilk™ con GMP es significativamente más aceptable en sujetos adultos tanto con PKU como sin PKU en comparación con Phenex-2™ a base de AA.

**45** En el estudio, 27 adultos sin PKU y 4 adultos con PKU tomaron muestras tanto de Bettermilk™ como de Phenex-2™. Luego, los participantes calificaron la aceptabilidad de cada producto en una escala de 1-8. 1 – me desagrada enormemente; 2 – me desagrada mucho, 3 - no me gusta, 4 - me desagrada un poco, 5 – me gusta un poco, 6 – me gusta, 7 - me gusta mucho y 8 – me encanta. Los resultados se muestran en la Figura 11. Como se puede ver en los datos presentados, los participantes calificaron los alimentos con GMP con una puntuación mucho mayor que la fórmula de AA en todos los criterios de aceptabilidad (olor, sabor, retrogusto y global), y la diferencia en la aceptabilidad fue sustancialmente superior para los participantes con PKU en comparación con los participantes sin PKU. Esto proporciona una evidencia adicional de las ventajas de los alimentos medicinales con GMP de la invención en comparación con las fórmulas de aminoácidos convencionales.

#### **55 Ejemplo 7: Efectos de los alimentos con GMP en comparación con los aminoácidos en los niveles de grelina en individuos con PKU**

**60** Dado el potencial de los alimentos medicinales con GMP para potenciar la saciedad, el objetivo de este estudio fue evaluar la saciedad usando una escala analógica visual (VAS), y comparar las concentraciones en plasma de grelina en individuos con PKU alimentados con desayuno de alimentos medicinales con GMP en comparación con un desayuno a base de AA.

**65** Usando los datos adicionales del estudio informados anteriormente en el Ejemplo 4 anterior, este estudio demuestra

la capacidad de un desayuno de alimentos con GMP para potenciar la saciedad y afectar a las concentraciones en plasma de la hormona grelina estimulante del apetito en las personas con PKU en comparación con un desayuno a base de AA. Las once personas con PKU (8 adultos y 3 niños entre 11 y 14 años) descritas en el Ejemplo 4 sirvieron como sus propios controles en un estudio metabólico para pacientes ingresados con dos tratamientos de 4 días: una 5 dieta a base de AA seguida de una dieta reemplazando toda fórmula de AA por alimentos de GMP. La concentración en plasma de grelina se obtuvo antes y 180 minutos después del desayuno. La saciedad se evaluó usando una escala analógica visual antes, inmediatamente después y 150 minutos después del desayuno. La concentración de grelina postprandial fue significativamente menor ( $p = 0,03$ ) con GMP en comparación con un desayuno a base de AA, sin diferencias en la grelina en ayunas. Las concentraciones más bajas de grelina postprandial se asociaron con 10 una mayor sensación de plenitud después del desayuno, lo que sugiere una mayor saciedad con GMP en comparación con los AA. Estos resultados muestran una supresión sostenida de la grelina, y sugieren una mayor saciedad con la ingesta de una comida que contiene GMP en comparación con los AA.

#### Materiales y métodos

15 *Mediciones de la grelina en plasma*

Todas las muestras de sangre postprandial se extrajeron 180 minutos después del inicio (150 minutos después de la finalización) del desayuno. Para los últimos seis sujetos (Sujetos 6-11) también se obtuvieron muestras de sangre en 20 ayunas antes del desayuno en los 2 últimos días de la dieta de AA (días 3 y 4) y en los 2 últimos días de la dieta de GMP (días 7 y 8). Se midió la grelina total en plasma en muestras de ayunas ( $n = 6$ ) y postprandiales ( $n = 11$ ) mediante radioinmunoensayo (Linco Research, St. Charles, MO); para cada sujeto, se combinaron volúmenes iguales de plasma para los días 3 + 4 (dieta de AA) y días 7 + 8 (dieta de GMP) según lo confirmado por la 25 estabilidad observada del perfil de AA en plasma en estos días. La grelina total para el sujeto 2 se eliminó del análisis, porque el valor interpolado era un valor atípico estadístico claro que superaba en gran medida la máxima concentración en la curva patrón.

#### *Cuestionarios de VAS de motivación para comer*

30 Cada sujeto completó un cuestionario de VAS de cuatro preguntas de motivación para comer tres veces: antes del desayuno, inmediatamente después del desayuno y 2 horas después de terminar el desayuno para evaluar las medidas subjetivas del apetito y la saciedad. Cada pregunta consistía en una línea de 100 mm con enunciados opuestos a cada extremo. A los sujetos se les pidió que indicaran con una marca vertical el punto de la línea que mejor describía sus sensaciones en ese momento con respecto a las siguientes preguntas: (1) ¿Cuál es la magnitud de tu deseo de comer?;, (2) ¿Cuánta hambre tienes?; (3) ¿Cómo te sientes de lleno?; y (4) ¿Cuánta comida crees que puedes comer? (consumo prospectivo de comida, PFC). Se calculó una puntuación del apetito para reflejar las cuatro preguntas en cada cuestionario de VAS de motivación para comer usando la fórmula: Puntuación del apetito (mm) = [deseo de comer + hambre + (100-plenitud) + PFC]/4.

35

#### 40 *Análisis estadístico*

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico R para Mac OS X versión 2.9 (R Project for Statistical Computing, Wirtschaftsuniversität, Viena, Austria). Los análisis primarios se realizaron mediante pruebas t pareadas de dos colas, emparejamiento en el sujeto. Las pruebas se consideraron significativas a  $p < 0,05$ ; los 45 valores son las medias  $\pm$  ETM. Se compararon los valores de grelina en plasma en ayunas y postprandiales en cada tratamiento con dieta (por ejemplo, AA en ayunas frente a AA postprandial) y entre los tratamientos con dieta (por ejemplo, AA en ayunas frente a GMP en ayunas) usando una prueba t pareada, emparejamiento en el sujeto. Se compararon los cuestionarios de VAS de motivación para comer en el último día de la dieta de AA y el último día de la dieta de GMP en las dietas (por ejemplo, AA en ayunas frente a AA postprandial) y entre las dietas (por ejemplo, 50 AA en ayunas frente a GMP en ayunas). El análisis secundario usó un modelo lineal de efectos mixtos para examinar el efecto de: IMC, tratamiento con dieta, edad, ingesta de macronutrientes en el desayuno, phe en plasma y valores en plasma (grelina, insulina y/o AA totales) en las respuestas a los cuestionarios diarios de VAS y valor de grelina en plasma, controlando para un efecto en el sujeto aleatorio. Si no hubo efecto en el sujeto, se usó un modelo lineal de efectos fijos. El mejor modelo se encontró usando la eliminación hacia atrás, eliminando variables 55 irrelevantes.

#### Resultados

##### *Perfiles de VAS de motivación para comer*

60 Los perfiles de VAS de motivación para comer no fueron significativamente diferentes en ningún punto temporal entre la dieta de AA (día 4) y la dieta de GMP (día 8). Sin embargo, como era de esperar, el perfil del apetito cambió significativamente antes, inmediatamente después y 2 h después de consumir el desayuno de AA o GMP (datos no mostrados). La ingesta de proteínas se identificó como la variable significativa más común para los cuestionarios de VAS usando el modelo estadístico de efectos mixtos. El contenido de proteínas del desayuno mostró una asociación 65 significativamente negativa con la puntuación del apetito inmediatamente después del desayuno ( $p = 0,01$ ) de

manera que la puntuación del apetito disminuyó con una mayor ingesta de proteínas en el desayuno. En el modelo final para la puntuación del apetito inmediatamente después del desayuno, otros factores importantes además del contenido de proteínas incluyeron el IMC, la edad y la interacción entre el tratamiento con dieta y el día del estudio. El IMC afectó significativamente a las respuestas de VAS en todos los puntos temporales en el análisis del modelo de efectos mixtos. Un IMC más alto se asoció con un mayor deseo de comer, más hambre y más apetito y una menor sensación de plenitud.

#### *Grelina en plasma*

- 10 La concentración de grelina en plasma obtenida después de una noche de ayuno no fue significativamente diferente entre las dietas de AA y de GMP (véase la Fig. 12) y no hubo asociaciones significativas entre las concentraciones de grelina en plasma en ayunas y una variedad de variables. En particular, no se encontró asociación directa entre la grelina en ayunas y el IMC en esta población de muestra diversa. La concentración total de AA en el plasma en ayunas tampoco fue significativamente diferente entre las dos dietas (datos no mostrados). La concentración de grelina en plasma postprandial, tomada 180 minutos después del inicio del desayuno con AA, no fue diferente de la grelina en ayunas antes de ingerir el desayuno con AA (Fig. 12). Por el contrario, el desayuno de GMP indujo una concentración de grelina en plasma postprandial significativamente inferior, una respuesta esperada después de una comida. Además, la grelina postprandial después del desayuno con GMP fue significativamente inferior a la grelina postprandial después del desayuno de AA. No hubo asociaciones significativas entre las concentraciones de grelina postprandiales y el IMC. Usando la eliminación hacia atrás con un modelo lineal de efectos mixtos, el único factor que predijo la grelina postprandial fue el tratamiento con la dieta, en el que la grelina en plasma postprandial fue más baja con el desayuno de GMP. La concentración postprandial de grelina en plasma fue un factor significativo en la predicción de la plenitud 2 h después del desayuno (véase la Fig. 13). Las puntuaciones más altas de plenitud se asociaron significativamente con concentraciones más bajas de grelina postprandial, tratamiento con dieta y la interacción entre la grelina y la dieta.

#### Discusión

- 30 La ausencia de una fuente de proteínas en una comida puede provocar una mayor sensación de hambre durante todo el día. El sabor y la preferencia mejorados combinados con la capacidad de hacer una variedad de alimentos de buen sabor con GMP respaldan la noción de que el GMP puede mejorar el tratamiento con la dieta de la PKU al proporcionar una fuente de proteínas que se puede espaciar más fácilmente durante el día. Además, los presentes inventores informan por primera vez que la ingesta de proteína intacta del GMP en comparación con los AA sintéticos produce la supresión sostenida de la grelina después de una comida en las personas con PKU.
- 35 La grelina es la única hormona orexigénica conocida, con las concentraciones más altas en ayunas y antes de una comida, mientras que las concentraciones se suprimen después de una comida. No se encontraron diferencias en la concentración de grelina en ayunas al comparar los desayunos de AA y de GMP en 3 niños (edades 11-14) y 8 adultos con PKU que sirvieron como su propio control.
- 40 Los datos proporcionan información novedosa sobre la respuesta de la grelina a una comida. Los presentes inventores demuestran que los tratamientos de desayunos isocalóricos que contienen la proteína intacta del GMP en comparación con los AA sintéticos inducen una respuesta de la grelina diferente. Los niveles de grelina disminuyen después de una comida en proporción con el contenido calórico, y las proteínas y los hidratos de carbono suprimen la grelina en una medida similar en los estudios con sustitución isocalórica del 20 % de energía o mayor de proteína o hidratos de carbono. Por lo tanto, es poco probable que la mayor proporción de energía proporcionada por los hidratos de carbono en el desayuno de GMP (7,8 %) explique la respuesta diferencial de la grelina observada en este estudio.
- 45 50 La concentración de grelina solo se midió en dos puntos temporales, en ayunas y 180 min después del inicio del desayuno, por lo tanto, el punto más bajo probablemente se perdió. Sin embargo, la disminución significativa observada en las concentraciones de grelina entre estos dos puntos temporales con el desayuno de GMP, pero no de AA, muestra que la ingesta de un desayuno de AA no permite la supresión sostenida de la grelina 180 minutos después del desayuno. De hecho, la señal de hambre de la grelina 3 h después de la comida de AA no fue diferente a la posterior a un ayuno de 12 h. Una mayor supresión de grelina después de una comida con proteína intacta en comparación con los AA puede deberse a variaciones en la velocidad de absorción de los AA sintéticos en comparación con el GMP. La aparición de los AA en el plasma se produce en el transcurso de la hora posterior al consumo de AA y aproximadamente 2 h con el consumo de una proteína intacta comparable. Se ha demostrado que la absorción rápida de los AA afecta negativamente a la retención y la utilización de proteínas en ratas y seres humanos.

60 Aunque la consecuencia más importante del consumo de AA a largo plazo puede ser la retención reducida de proteína, el aumento brusco de la concentración de AA en plasma también afecta a las señales fisiológicas de la saciedad. La hipótesis aminoestática propone que un aumento en las concentraciones en plasma de AA viene acompañada de una mayor estimulación de las hormonas gastrointestinales y una disminución del apetito seguida de un retorno del apetito cuando las concentraciones en plasma de AA disminuyen (S. M. Mellinkoff, M. Frankland,

D. Boyle, M. Greipel, "Relationship between serum amino acid concentration and fluctuations in appetite" 1956, *Obes. Res.* 5 (1997) 381-384). Por lo tanto, las proteínas del suero de la leche, tales como el GMP, pueden disminuir el apetito debido a la absorción rápida y a los niveles sostenidos de AA en plasma, mientras que los AA sintéticos provocan un aumento agudo en los AA en plasma que desaparecen del plasma más rápido y en mayor grado en comparación con la proteína intacta, produciendo un aumento del apetito poco después de una comida. En apoyo de esta hipótesis, un desayuno que contenía GMP indujo concentraciones de AA en plasma postprandial total más alto y concentraciones de grelina más bajas en comparación con los AA sintéticos. Además, nuestros datos muestran una asociación entre una menor concentración de grelina postprandial y una mayor sensación de plenitud, lo que sugiere que una comida de GMP mantiene la saciedad en comparación con los AA.

La supresión de la grelina se regula por la retroalimentación postgástrica (D. L. Williams, D. E. Cummings, H. J. Grill, J. M. Kaplan, "Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback" (*Endocrinology* 144 (2003) 2765-2767), que requiere nutrientes luminales en el intestino distal, no en el estómago o el duodeno. El rápido aumento de los AA en plasma tras el consumo de una fórmula a base de AA sugiere que los nutrientes luminales están presentes durante un tiempo más corto, limitando, por lo tanto, su capacidad para suprimir la grelina.

Además, la grelina funciona de manera recíproca con la insulina (D. E. Cummings, J. Q. Purnell, R. S. Frayo, K. Schmidova, B. E. Wisse, D. S. Weigle, "A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans", *Diabetes* 50 (2001) 1714-1719). De manera similar, los presentes resultados muestran que la concentración de insulina en plasma postprandial es más alta y la de la grelina más baja después de un desayuno que contiene GMP en comparación con un desayuno a base de AA. Por lo tanto, los alimentos de GMP pueden mejorar la regulación de la insulina y la grelina, la señalización de la saciedad y la retención de proteínas en individuos con PKU en relación con las dietas de aminoácidos convencionales.

## 25 Conclusión

El tratamiento nutricional de la PKU está en la necesidad de nuevas opciones dietéticas, además de los AA sintéticos para facilitar la ingesta de una fuente de proteínas baja en Phe durante todo el día con el fin de mejorar el control metabólico y controlar el hambre. Estos resultados confirman la importancia del consumo de proteínas en una comida para mejorar la saciedad y proporcionan nuevas evidencias de que un desayuno de GMP suprime los niveles en plasma de la hormona de la saciedad gredina durante un período de tiempo más largo en comparación con un desayuno de AA. Los productos alimentarios elaborados con la proteína intacta, baja en Phe GMP son una primera etapa para proporcionar una dieta más fisiológicamente completa que mejore las opciones dietéticas, y facilite la distribución de proteínas y el control metabólico de la PKU.

### 35 Ejemplo 8: Complementación de aminoácidos recomendada para la presente invención

En el presente ejemplo profético, los inventores presentan cantidades recomendadas de complementos de aminoácidos para la presente invención. En particular, los inventores proporcionan variaciones recomendadas de las 40 cantidades complementadas usadas en los ejemplos de trabajo previos.

*Metionina.* Los inventores no recomiendan que se añada metionina a los alimentos medicinales de la presente invención. Recientemente, se ha determinado que las necesidades mínimas de metionina más cisteína para niños y adultos en edad escolar es significativamente menor de lo que se pensaba anteriormente (Turner, *et al.*, *Am J Clin Nutr* 2006; 83:619-23; Ball, *et al.*, *J Nutr* 2006; 136 (supl 2):1682S-93S). Esto sugiere que el GMP contiene una cantidad adecuada de metionina, y que no se requiere la administración de complementos de metionina. Como la metionina es un aminoácido que contiene azufre con un sabor desagradable, la no complementación de los alimentos a base de GMP con metionina aumentará aún más la palatabilidad de los alimentos.

*50 Arginina.* En contraste con los ejemplos presentados anteriormente, los inventores recomiendan complementar el GMP de los alimentos medicinales de la invención con arginina adicional. En concreto, los inventores proponen la adición de arginina a los alimentos medicinales de la invención de modo que la proporción en peso total dentro del alimento de la arginina con respecto a la proteína sea preferentemente de aproximadamente 60 a 90 miligramos de arginina/gramo de proteína total, y más preferentemente de aproximadamente 75 miligramos de arginina/gramo de proteína total.

Aunque la arginina se reconoce en la técnica como un aminoácido prescindible nutricionalmente (Tharakan *et al.*, *Clin Nutr* 2008; 27:513-22), la arginina tiene múltiples funciones no nutricionales, que incluyen servir como sustrato para la síntesis de proteína, urea y óxido nítrico (el cofactor para PAH, tetrahidrobiopterina, también es el cofactor de la óxido nítrico sintetasa). La arginina se sintetiza en el riñón a partir de la citrulina intestinal derivada de la glutamina y se oxida en la ornitina en el ciclo de la urea. De acuerdo con la arginina mínima en el GMP, las concentraciones en plasma de arginina y ornitina informadas en los ensayos clínicos del Ejemplo 4 fueron significativamente menores con la ingesta de la dieta de GMP en comparación con la dieta de AA (véase la Tabla 14). Por lo tanto, los inventores concluyen que GMP debe complementarse con arginina para su utilización en la dieta para la PKU.

*65 Leucina.* Los inventores recomiendan complementar los alimentos medicinales de la presente invención con una

- cantidad de leucina que sea sustancialmente superior a la indicada por cualquier necesidad de ingesta recomendada publicada o a la cantidad usada en cualquiera de los ejemplos de trabajo anteriores. En concreto, los inventores proponen añadir leucina a los alimentos medicinales de la invención de modo que la proporción en peso total dentro del alimento de leucina con respecto a la proteína es preferentemente de aproximadamente 100 a 200 miligramos de leucina/gramo de proteína total, y más preferentemente de aproximadamente 100 miligramos de leucina/gramo de proteína total.
- Los inventores han determinado que los niveles en plasma elevados de leucina pueden inhibir competitivamente el transporte de Phe a través de la mucosa intestinal y de la barrera hematoencefálica a través de una cierta proteína transportadora. Por lo tanto, la complementación con leucina más allá de los niveles de necesidad nutricional puede reducir sorprendentemente los niveles de Phe en plasma y cerebro, el órgano principal en el que la Phe ejerce sus efectos neurotóxicos. Los mayores niveles de leucina recomendados, entonces, pueden conducir a menores niveles de Phe en plasma y cerebro en individuos con PKU usando los alimentos a base de GMP de la invención.
- Además, la evidencia reciente demuestra que la leucina estimula la síntesis de proteína del músculo esquelético mediante la mejora de las tasas de iniciación de la traducción del ARNm (Norton L. E. et al., *J Nutr* 2009; 139:1103-1109 y Crozier, S. J. et al., *J Nutr* 2005; 135:376-382). La síntesis mejorada de la proteína del músculo esquelético en las personas con PKU reduciría los niveles de Phe en sangre y podría aumentar la masa corporal magra.
- Tirosina.* No se añade una cantidad complementada de tirosina a los alimentos medicinales para el tratamiento de los trastornos del metabolismo de la tirosina, tales como la tirosinemia. Para otras aplicaciones, incluyendo una dieta para la PKU, los inventores recomiendan complementar los alimentos medicinales de la presente invención con una cantidad de tirosina que sea algo superior a la cantidad usada en cualquiera de los ejemplos de trabajo anteriores. En concreto, los inventores proponen añadir tirosina a los alimentos medicinales no tratados térmicamente de la invención de modo que la proporción en peso total inicial en el alimento de tirosina con respecto a la proteína sea preferentemente de aproximadamente 62 a 93 miligramos de tirosina/gramo de proteína total, y más preferentemente de aproximadamente 85 miligramos de tirosina/gramo de proteína total.
- La tirosina es un AA importante en la dieta para la PKU, porque es indispensable y un precursor de adrenalina, norepinefrina, melanina y tiroxina. En el Ejemplo 4 anterior, los inventores encontraron que las concentraciones de tirosina en plasma obtenidas en las muestras postprandiales o en ayunas no fueron significativamente diferentes con la ingesta de las dietas de GMP o de AA (véase la Tabla 4 anterior). Las concentraciones de tirosina en plasma después de un ayuno nocturno disminuyeron en comparación con las concentraciones postprandiales con la ingesta tanto de la dieta de GMP como de AA. Sin embargo, la dieta de GMP produjo una concentración media de tirosina en ayunas que estaba por debajo del intervalo normal. Por lo tanto, los inventores recomiendan la complementación con tirosina por encima del nivel de complementación de la ADR del 150 % de los alimentos ensayados en el Ejemplo 4.
- Además, en el Ejemplo 5 anterior, los inventores encontraron que cuando los EP aportados por los aminoácidos añadidos se contabilizaron en el denominador, los valores calculados corregidos coincidieron con los valores observados ( $p > 0,05$ ) de todos los aminoácidos medidos, a excepción de la Tyr ( $p < 0,05$ ) (véase la Tabla 20 anterior, columna E en comparación con F). El valor de Tyr más bajo de lo esperado sugiere que Tyr se degradó en algún momento durante el proceso de fabricación o de almacenamiento. Aunque la ADR para la Tyr se cubrió en el alimento de GMP (que se complementó al 150 % de la ADR), el aumento de la complementación con Tyr proporcionaría un mayor nivel de Tyr.
- Triptófano.* No se añade una cantidad complementada de triptófano a los alimentos medicinales para el tratamiento de los trastornos del metabolismo del triptófano, tales como la hipertriptofanemia. Para otras aplicaciones, incluyendo para una dieta para la PKU, los inventores proponen añadir opcionalmente triptófano a los alimentos medicinales de la invención de modo que la proporción en peso total inicial del alimento de triptófano con respecto a la proteína sea preferentemente de aproximadamente 12 a 14 miligramos de triptófano/gramo de proteína total, y más preferentemente de aproximadamente 12 miligramos de triptófano/gramo de proteína total.
- En el Ejemplo 4, los inventores observaron una reducción del 29 % en los niveles de Trp en plasma postprandial con la dieta de GMP en comparación con la dieta de AA. Los niveles de Trp en la dieta de GMP estaban muy por debajo del intervalo de Trp de las fórmulas AA (~15 mg de Trp/g de proteína). También hay evidencia de que el Trp es importante en la síntesis del neurotransmisor serotonina (Passcuchi et al., *Intl J Neuropsychopharmacology* (2009), 12:1067-79). Por lo tanto, los niveles recomendados están significativamente por encima del intervalo establecido usando del 130 al 160 % de las pautas de ingesta mínima recomendadas publicadas por la OMS (Organización Mundial de la Salud, necesidades de proteínas y aminoácidos en la nutrición humana, Ginebra, Suiza: Universidad de las Naciones Unidas, 2007) o la cantidad recomendada basada en el 130 % de la ADR de 2002 (Instituto de Medicina, ingestas dietéticas de referencia para energía, hidratos de carbono, fibra, grasa, proteínas y aminoácidos, Washington, DC: National Academy Press, 2002).
- Histidina.* No se añade una cantidad complementada de histidina a los alimentos medicinales para el tratamiento de los trastornos del metabolismo de la histidina, tales como la histidinamia. Para otras aplicaciones, incluyendo para

una dieta para la PKU, los inventores proponen añadir opcionalmente histidina a los alimentos medicinales de la invención de modo que la proporción en peso total inicial del alimento de histidina con respecto a la proteína sea preferentemente de aproximadamente 20 a 24 miligramos de histidina/gramo de proteína total, y más preferentemente de aproximadamente 23 miligramos de histidina/gramo de proteína total. El intervalo preferido se basa en el 130-160 % de las pautas de ingesta mínima recomendadas publicadas por la OMS (Organización Mundial de la Salud, necesidades de proteínas y aminoácidos en la nutrición humana, Ginebra, Suiza: Universidad de las Naciones Unidas, 2007). El valor más preferido se basa en el 130 % de la ADR de 2002 (Instituto de Medicina, ingestas dietéticas de referencia para energía, hidratos de carbono, fibra, grasa, proteínas y aminoácidos, Washington, DC: National Academy Press, 2002). A diferencia de las recomendaciones para el resto de aminoácidos, estos valores recomendados para la histidina no varían de lo que está contenido en los alimentos medicinales de GMP usados en los ejemplos de trabajo.

Basándose en las cantidades complementadas de los aminoácidos presentadas en el presente ejemplo, pueden producirse alimentos medicinales a base GMP mejorados para proporcionar la proteína necesaria para individuos con PKU, funcionando a la vez para reducir al mínimo los niveles de Phe en el plasma sanguíneo y en el tejido cerebral.

Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que la experimentación de rutina, numerosos equivalentes a los materiales y métodos específicos descritos en el presente documento. Dichos equivalentes se consideran dentro del alcance de la presente invención y están englobados por las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un alimento medicinal para su uso en el tratamiento de un trastorno metabólico que es un trastorno del metabolismo de la fenilalanina, un trastorno del metabolismo de la tirosina, un trastorno del metabolismo del triptófano o un trastorno del metabolismo de la histidina, comprendiendo el alimento medicinal glicomacropéptido (GMP) y cantidades complementadas de dos o más aminoácidos, en el que uno de los aminoácidos complementados es arginina y la proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido arginina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 60 a 90 miligramos de arginina/gramo de proteína total, y en el que otro de los aminoácidos complementados es la leucina y la proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido leucina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 100 a 200 miligramos de leucina/gramo de proteína total.
2. El alimento medicinal para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una cantidad complementada del aminoácido tirosina, y en el que la proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido tirosina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 62 a 93 miligramos de tirosina/gramo de proteína total.
3. El alimento medicinal para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el peso total de los aminoácidos complementarios adicionales es del aproximadamente 22 % al 38 % del peso total de la proteína del GMP y los aminoácidos complementados juntos.
4. El alimento medicinal para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además una cantidad complementada de los aminoácidos triptófano e histidina, en el que el peso total de los aminoácidos complementarios adicionales es del aproximadamente 25 % al 42 % del peso total de la proteína del GMP y de los aminoácidos complementados juntos.
5. El alimento medicinal para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido arginina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 75 miligramos de arginina/gramo de proteína total, y en el que otro de los aminoácidos complementados es leucina, y la proporción en peso en el alimento medicinal del aminoácido leucina con respecto a la proteína total es de aproximadamente 100 miligramos de leucina/gramo de proteína total, y que, cuando se complementa con tirosina, la proporción en peso del aminoácido tirosina con respecto a la proteína total es, por ejemplo, de 85 miligramos de tirosina/gramo.
6. El alimento medicinal para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el alimento medicinal no contiene una cantidad complementada del aminoácido tirosina, y en el que el alimento medicinal contiene menos de 2,0 miligramos de fenilalanina y tirosina juntas por cada gramo de proteína total.
7. El alimento medicinal para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el peso total de los aminoácidos complementarios adicionales es del aproximadamente 16 % al 29 % del peso total de la proteína del GMP y los aminoácidos complementados juntos.
8. El alimento medicinal para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además una cantidad complementada de los aminoácidos triptófano e histidina, en el que el peso total de los aminoácidos complementarios adicionales es del aproximadamente 19 % al 33 % del peso total de la proteína del GMP y de los aminoácidos complementados juntos.
9. El alimento medicinal para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, alimento medicinal que se encuentra en forma de una bebida, una barrita, una oblea, un pudín, una gelatina, una galleta salada, una piel de fruta, una mantequilla de frutos secos, una salsa, un aderezo para ensalada, un cereal crujiente, un copo, una hojaldre, un microgránulo o un sólido extruido.
10. El alimento medicinal para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, alimento que no contiene cantidades complementadas del aminoácido metionina.
11. El alimento medicinal para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el GMP se purifica de manera que el GMP comprende no más de 2,0 miligramos de contaminante de fenilalanina por gramo de proteína del GMP, y en el que el alimento medicinal contiene menos de 1,5 miligramos de fenilalanina por gramo de proteína total.
12. El alimento medicinal para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que es para su uso en el tratamiento de un trastorno del metabolismo de la fenilalanina.
13. El alimento medicinal para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, que se usa en el tratamiento de la fenilcetonuria.

14. Un método de preparación de un alimento medicinal para el tratamiento de un trastorno metabólico que es un trastorno del metabolismo de la fenilalanina, un trastorno del metabolismo de la tirosina, un trastorno del metabolismo del triptófano o un trastorno del metabolismo de la histidina, comprendiendo el método las etapas de:

- 5       (a) proporcionar glicomacropéptido (GMP) y cantidades complementadas de dos o más aminoácidos, en el que uno de los aminoácidos complementados es arginina y la proporción en peso del aminoácido arginina proporcionada con respecto a la proteína total proporcionada es de aproximadamente 60 a 90 miligramos de arginina/gramo de proteína total, y en el que el segundo aminoácido complementado es leucina y la proporción en peso del aminoácido leucina proporcionada con respecto a la proteína total proporcionada es de aproximadamente 100 a 200 miligramos de leucina/gramo de proteína total; y  
10      (b) mezclar los materiales proporcionados con uno o más ingredientes no proteicos para elaborar un alimento.

15. El método de la reivindicación 14, en el que se proporciona además una cantidad complementada de un tercer aminoácido, tirosina, de modo que la proporción en peso del aminoácido tirosina proporcionada con respecto a la proteína total proporcionada es de aproximadamente 62 a 93 miligramos de tirosina/gramo de proteína total.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, que comprende además la etapa de purificar el GMP de modo que no contenga más de 2,0 mg de contaminante de fenilalanina por gramo de proteína del GMP, y opcionalmente, en el que la etapa de purificación del GMP para que contenga no más de 2,0 mg de contaminante de fenilalanina por gramo de proteína del GMP comprende además el uso de uno o más del grupo que consiste en cromatografía de intercambio catiónico, ultrafiltración y diafiltración.

17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14-16, que comprende además la etapa de tratar térmicamente el alimento, en el que:

- 25      (a) la proporción en peso inicial del aminoácido arginina proporcionado con respecto a la proteína total proporcionada antes del tratamiento térmico es superior a aproximadamente 75 miligramos de arginina/gramo de proteína total, y la proporción en peso inicial del aminoácido leucina con respecto a la proteína total proporcionada antes del tratamiento térmico es superior a aproximadamente 100 miligramos de leucina/gramo de proteína total, y cuando se complementa con tirosina, la proporción en peso inicial del aminoácido tirosina proporcionado con respecto a la proteína total proporcionada antes del tratamiento térmico es superior a aproximadamente 85 miligramos de tirosina/gramo de proteína total;  
30      (b) la proporción en peso final del aminoácido arginina con respecto a la proteína total en el alimento después del tratamiento térmico es de aproximadamente 60 a 90 miligramos de arginina/gramo de proteína total, y la proporción en peso final del aminoácido leucina con respecto a la proteína total en el alimento después del tratamiento térmico es de aproximadamente 100 a 200 miligramos de leucina/gramo de proteína total, y cuando se complementa con tirosina, la proporción en peso final del aminoácido arginina con respecto a la proteína total en el alimento después del tratamiento térmico es de aproximadamente 60 a 90 miligramos de arginina/gramo de proteína total.

40      18. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14-17 que es para el tratamiento de la fenilcetonuria.

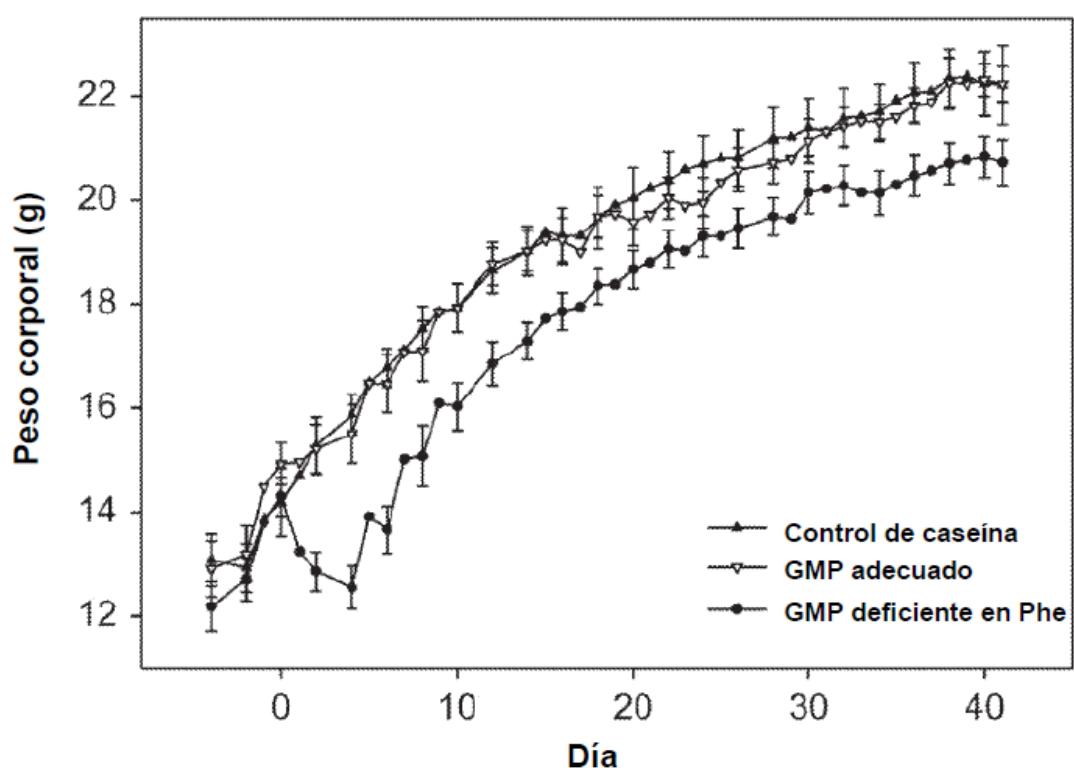


FIG. 1

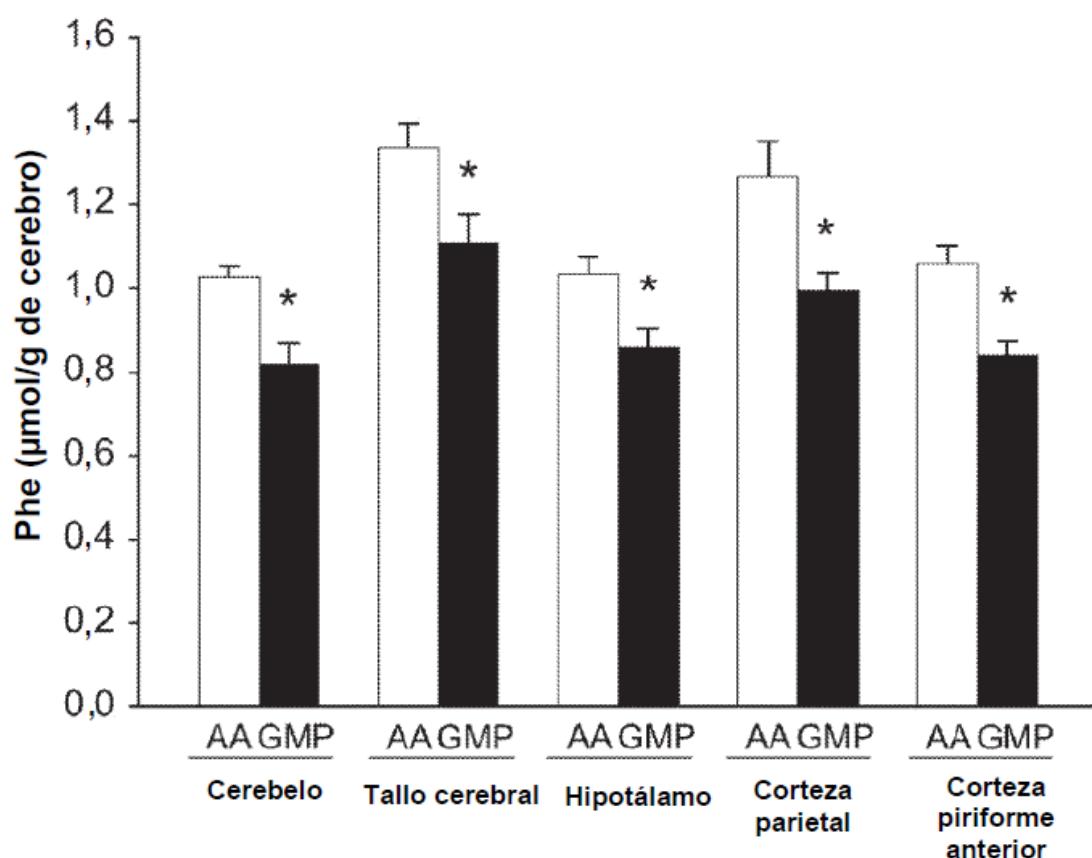


FIG. 2

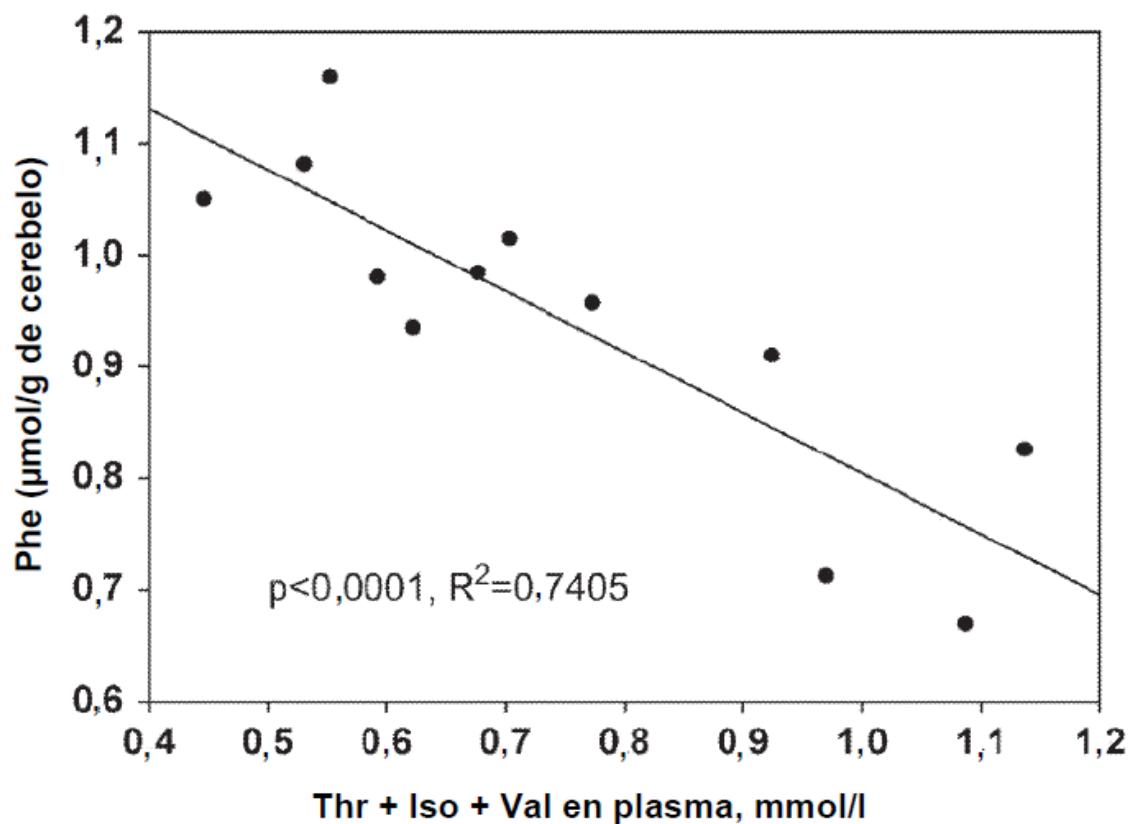


FIG. 3

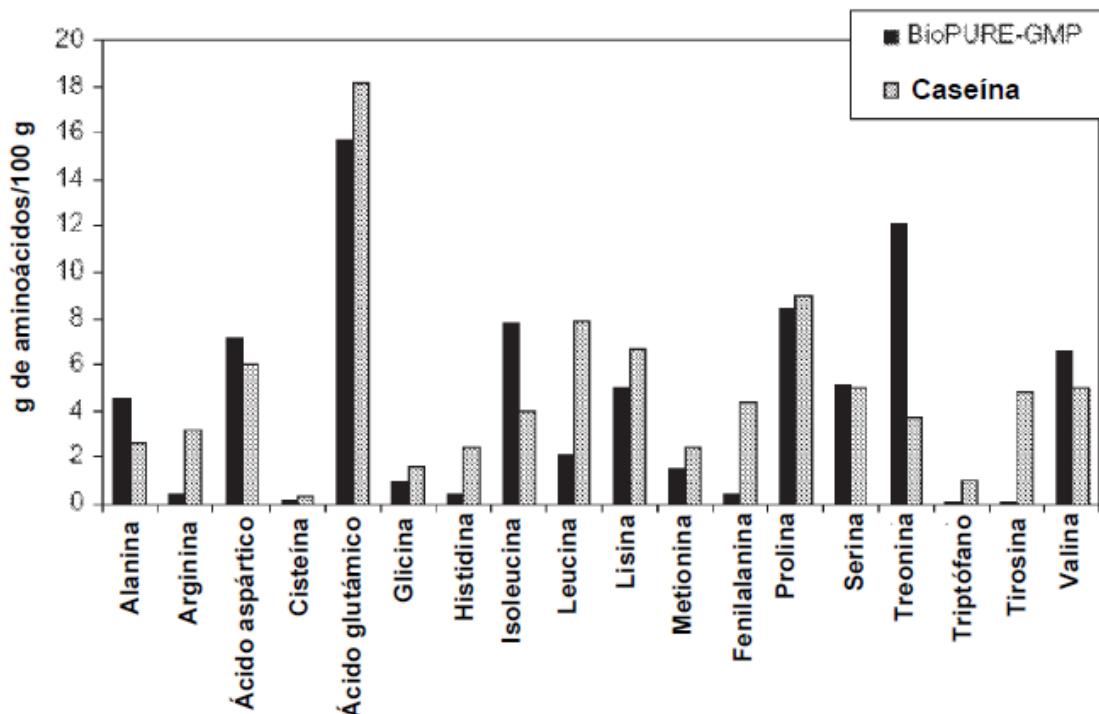


Fig. 4

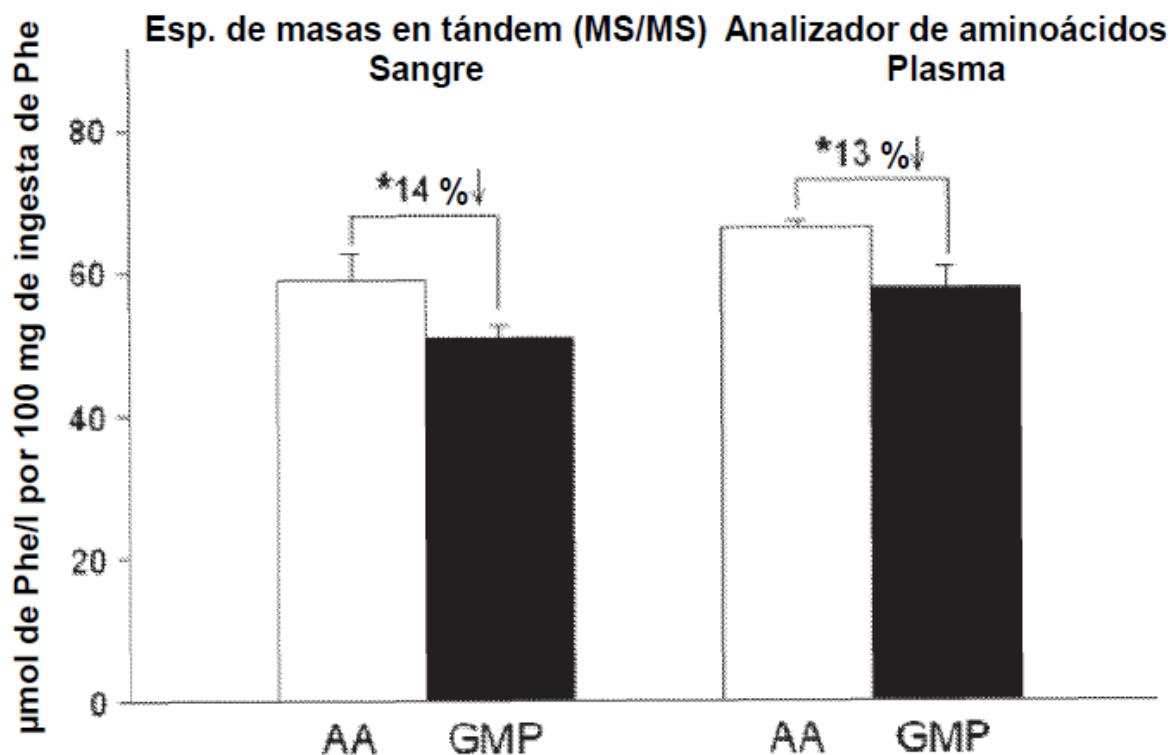


FIG. 5

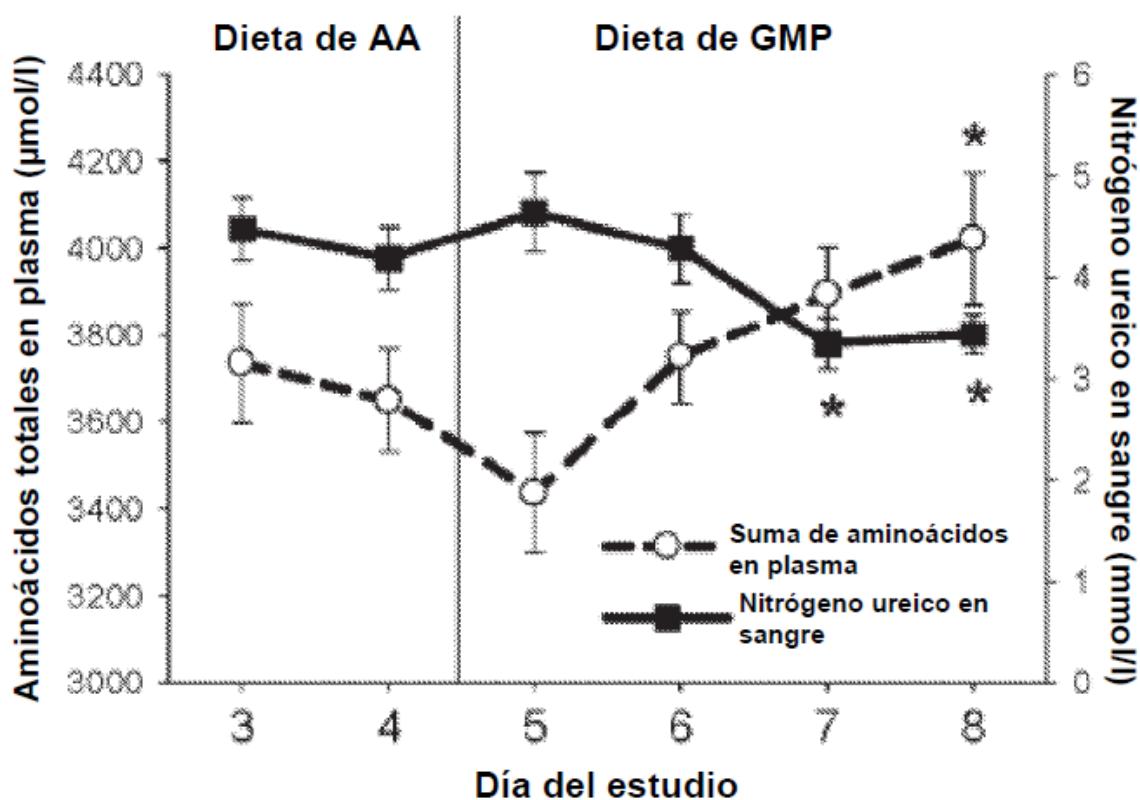


FIG. 6

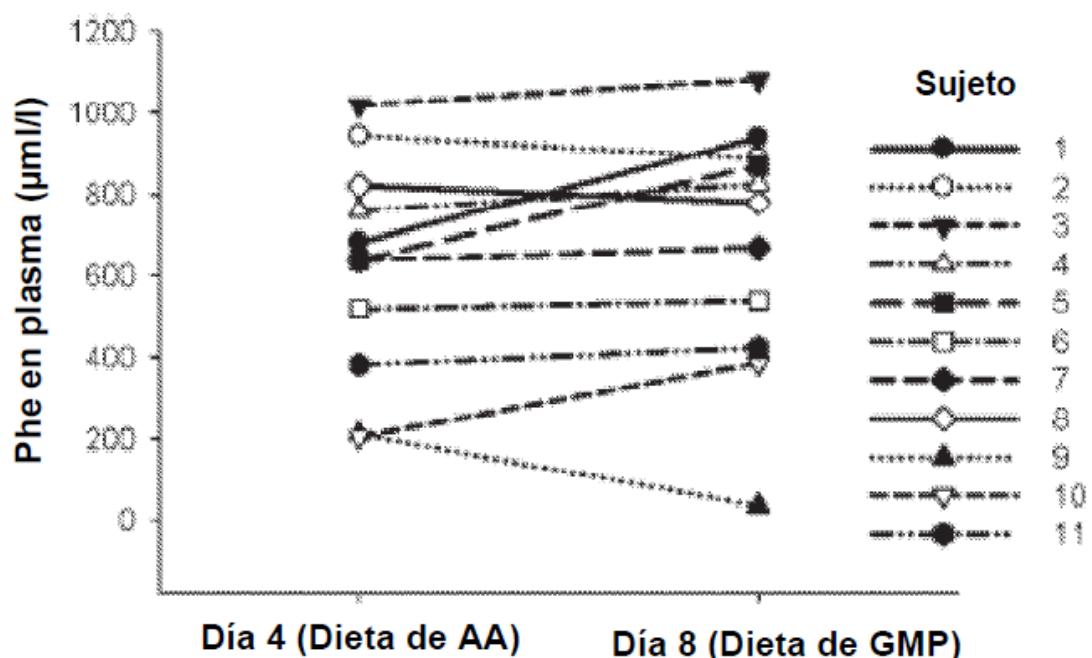


FIG. 7

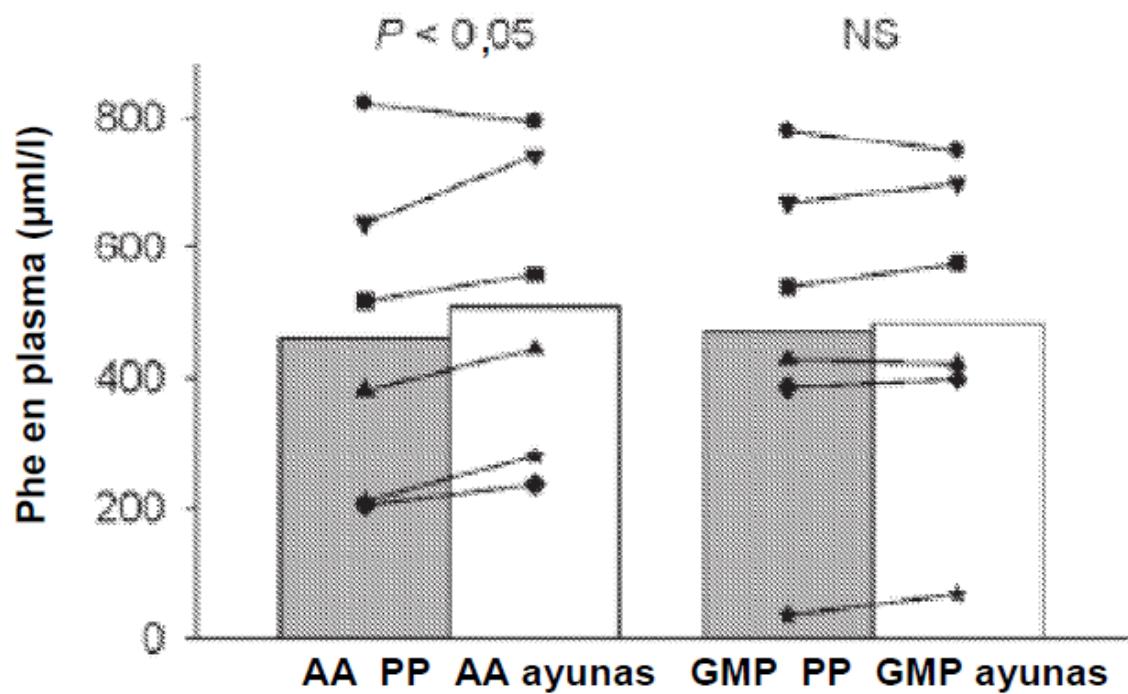


FIG. 8

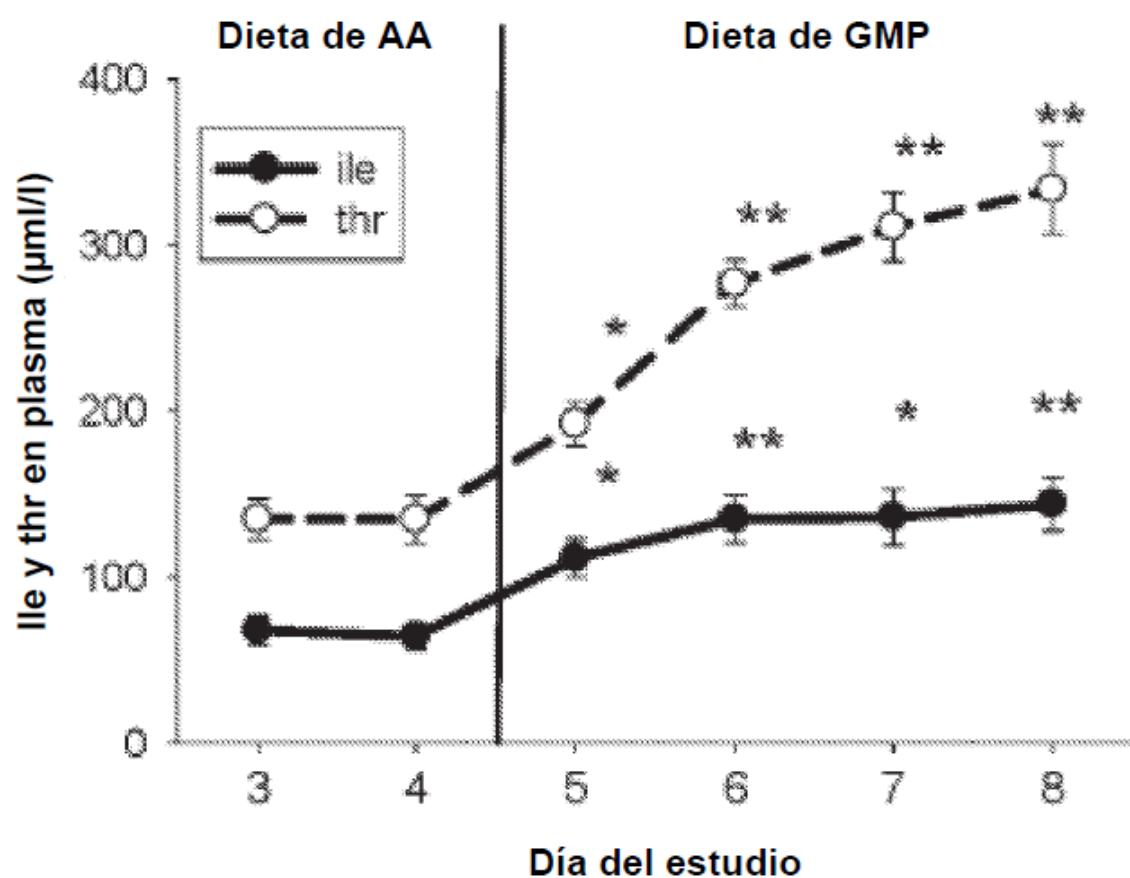


FIG. 9

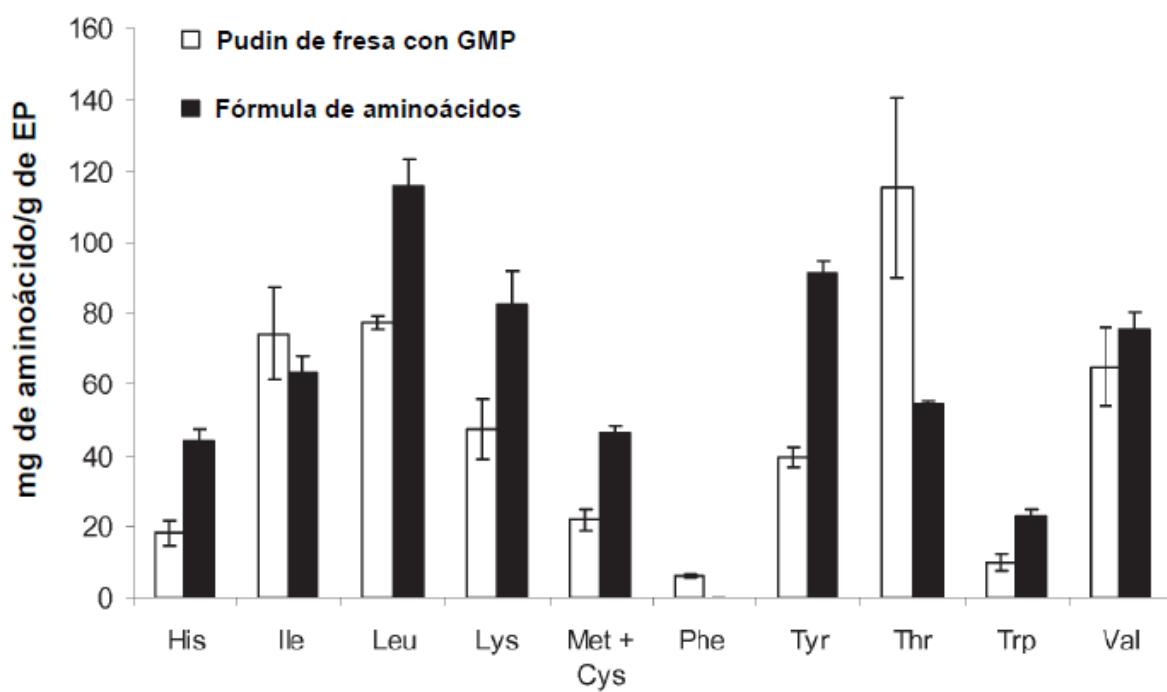


FIG. 10

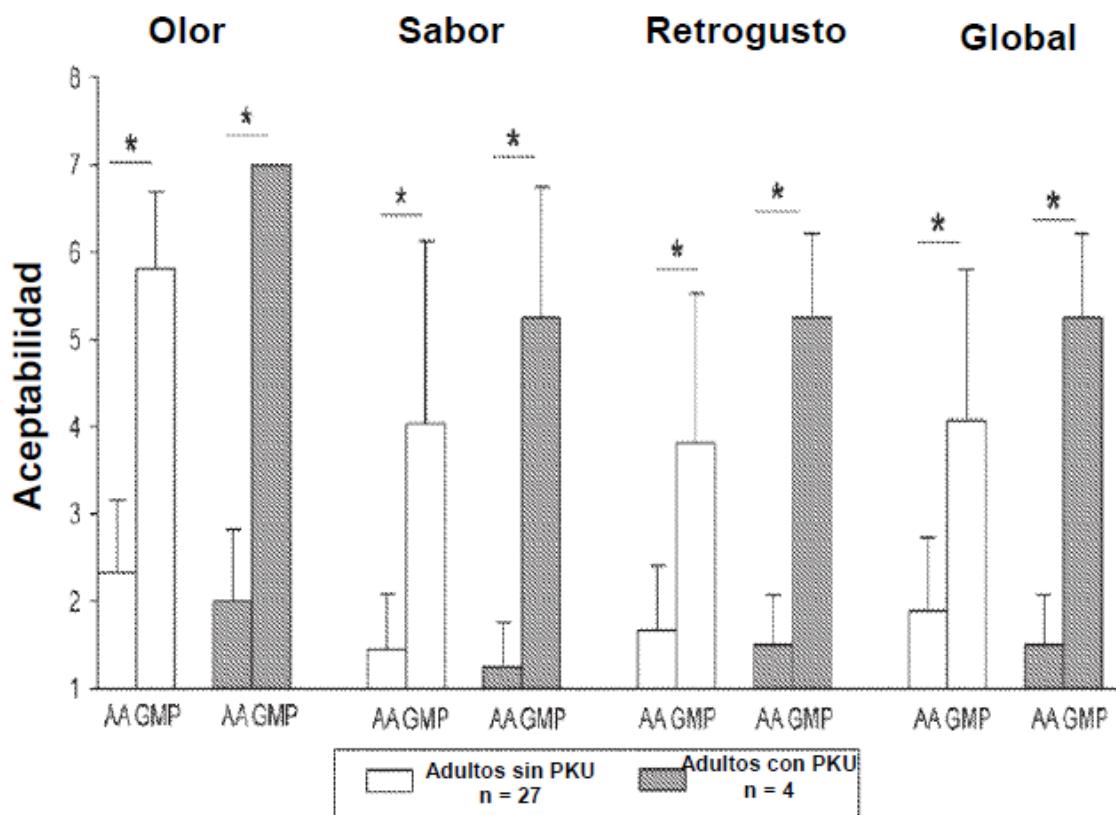


FIG. 11

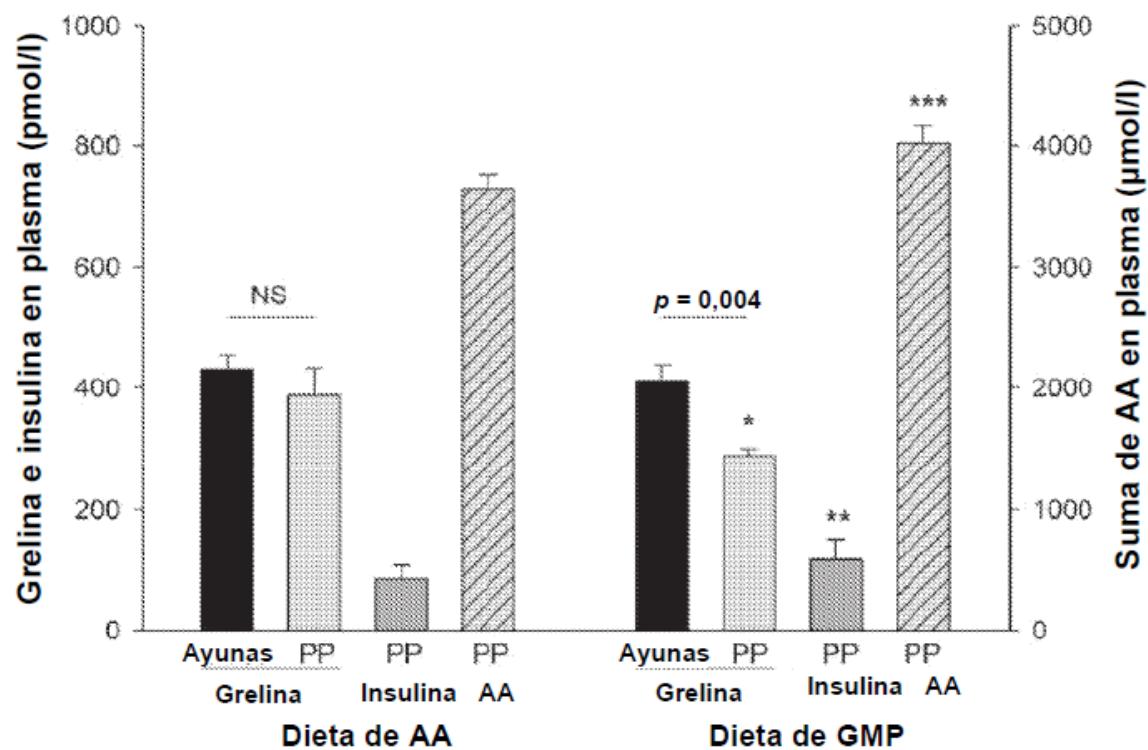


FIG. 12

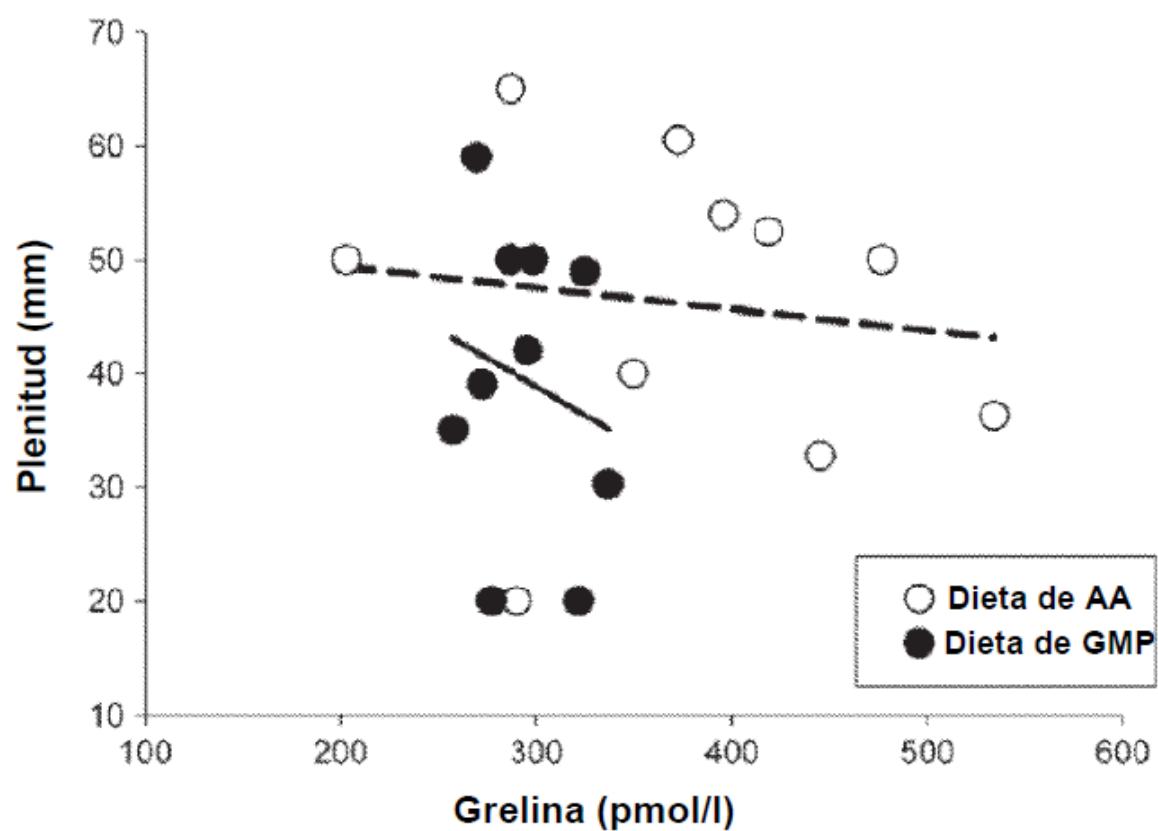


FIG. 13