

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 149**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/497** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2016** **E 16178332 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018** **EP 3115782**

54 Título: **Método para determinar la oxidación de proteínas**

30 Prioridad:

**09.07.2015 EP 15176054**

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

**27.05.2019**

73 Titular/es:

**HANZE NUTRITION B.V. (100.0%)**  
**Woldweg 239A**  
**9606 PE Kropswolde, NL**

72 Inventor/es:

**VONK, ROEL J.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 714 149 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

Método para determinar la oxidación de proteínas

- 5 La invención se refiere a un método para determinar cuantitativamente la oxidación de proteínas en un individuo a partir de muestras de prueba de exhalación. La invención se refiere además a nuevos sustratos de leche enriquecidos con  $^{13}\text{C}$  naturales aislados, que pueden usarse para obtener las muestras de prueba de exhalación para el método de la presente invención.

10 **Introducción**

La evaluación fácil y fiable del estado de las proteínas de un individuo sería muy valiosa en la investigación clínica y epidemiológica. Se ha encontrado que la medición directa de la oxidación de proteínas en la respiración es un parámetro directamente relacionado con esto.

- 15 Ya se ha descrito que, en principio, se pueden determinar reacciones de oxidación de proteínas en las muestras de prueba de exhalación utilizando las denominadas pruebas de exhalación de  $^{13}\text{C}$ . El principio general que subyace a las pruebas de exhalación de  $^{13}\text{C}$  se basa en la observación de enriquecimiento del  $^{13}\text{CO}_2$  en el aliento exhalado después de la administración (oral o intravenosa) y el metabolismo de un sustrato marcado con el isótopo estable de carbono  $^{13}\text{C}$ . El carbono  $^{13}\text{C}$  es un isótopo estable con una abundancia natural del 1,109 % (en comparación con la abundancia natural del  $^{12}\text{C}$  del 98,89 %). El isótopo de carbono  $^{13}\text{C}$  está libre de radiación (en contraste con el isótopo de carbono  $^{14}\text{C}$ ) y, por lo tanto, es seguro para su uso en personas vivas como animales, seres humanos y en particular niños, mujeres embarazadas y personas enfermas (pacientes). El análisis de isótopos de  $^{13}\text{C}$  en la respiración se puede llevar a cabo utilizando la espectrometría de masas por relación isotópica (IRMS, por sus siglas en inglés).

- 30 Para este propósito, a ciertos intervalos antes y después de la ingestión de un sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$ , se recogen muestras de respiración y se analizan con respecto al contenido de  $^{13}\text{C}$ . La etapa limitante de la velocidad de la ingestión del marcador (sustrato de  $^{13}\text{C}$ ) hasta su aparición en el producto metabólico final de  $^{13}\text{CO}_2$  en la respiración puede depender de la hidrólisis (digestión) del sustrato en la luz intestinal, sus procesos de transporte u otras etapas metabólicas. Finalmente, del sustrato inicialmente administrado se libera  $^{13}\text{CO}_2$ , que se exhala a través de la respiración.

- 35 Las pruebas de exhalación aplicadas hasta ahora se basan en la hipótesis de que, además de la etapa limitante de la velocidad a la que se ha hecho referencia, todos los demás procesos metabólicos se desarrollan de manera despreciable o, al menos, a una velocidad constante. Dependiendo de la elección del transporte de sustrato marcado con  $^{13}\text{C}$  apropiado y los procesos digestivos, pueden analizarse en consecuencia los procesos de absorción y oxidación o las actividades enzimáticas (bacterianas) mediante pruebas de exhalación de  $^{13}\text{C}$ . Mientras tanto, están disponibles varios sustratos de prueba marcados con  $^{13}\text{C}$  para diversos problemas de diagnóstico.

- 40 Braden et. Alabama; Deutsches Arzteblatt 2003; 100 (51-52) proporciona una visión general de diferentes aplicaciones de la prueba de exhalación de  $^{13}\text{C}$  y menciona entre otras cosas una prueba para examinar la actividad de la tripsina en una prueba de exhalación derivada de la proteína  $^{13}\text{C}$  utilizando clara de huevo marcada con  $^{13}\text{C}$ .

- 45 Wetzel y Fischer; Fischer Analysen Instrumente GmbH, Leipzig; 2005 mencionaron en su publicación " $^{13}\text{C}$  Breath Tests in Medical Research and Clinical Diagnosis" pruebas de exhalación de  $^{13}\text{C}$  con sustratos naturales ricos en proteínas, su idoneidad general para examinar la reabsorción y degradación metabólica de proteínas y, en particular, su aplicación para medir la actividad de la tripsina pancreática en el intestino delgado.

- 50 Boirie, Y. et al., Physiology 1997, vol. 94, pp. 14930-14935 y varios otros autores como, por ejemplo, Evenepoel et al., J Nutr 1997, 127: 327-331 y Evenepoel et al., J Nutr 1998, 128: 1716-1722 describieron pruebas de exhalación derivadas de la proteína  $^{13}\text{C}$  utilizando un sustrato de proteína de huevo altamente enriquecido con leucina marcada con  $^{13}\text{C}$ , y observando la cinética de la leucina.

- 55 Del mismo modo, Ghos Y. et "Use of Naturally  $^{13}\text{C}$ -enriched Substrates for the Study of Carbohydrate and Protein Assimilation by Means of  $^{13}\text{CO}_2$  Breath Tests", Applied Radiation and Isotopes, Int. J. of Radiation Applications and Instrumentation, Parte A, Vol. 39, No. 6, Pág. 584, 1988 y Y. Ghos y B. Beaufrere " $^{13}\text{C}$  protein breath tests", Gut 1998; 43 (Suppl. 3), S23-S24 describieron las pruebas de exhalación derivadas de la proteína  $^{13}\text{C}$  utilizando proteínas de huevo altamente enriquecidas y proteínas de la leche como la caseína con leucina marcada con  $^{13}\text{C}$ , y observando la cinética de la leucina.

- 60 Metges et al., British Journal of Nutrition 1992, 67, 43-55 se describe la determinación de la recuperación de  $^{13}\text{C}$  de dietas de leche marcadas con  $^{13}\text{C}$  a través de pruebas de exhalación de  $^{13}\text{C}$  en terneros lactantes.

- 65 Federica Camin et al. "Influence of dietary composition on the carbon, nitrogen, oxygen and hydrogen stable isotope ratios of milk", Rapid Commun. Mass Spectrom. 2008; 22: 1690-1696 describen investigaciones de relación isotópica

de elementos múltiples de leche y caseína derivadas de vacas alimentadas con una dieta mixta de C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> a base de maíz.

5 La patente US 2008/0281194 describe métodos para evaluar las funciones digestivas usando una prueba de exhalación usando proteínas, carbohidratos y lípidos con marcador incorporado, en la que las proteínas marcadas usadas son sustratos de proteína de huevo marcados liofilizados.

10 Sin embargo, ninguna de las evaluaciones descritas hasta ahora proporciona un método para determinar cuantitativamente la oxidación de proteínas mediante su medición directa en muestras de prueba de exhalación, derivadas de sustratos de proteínas marcadas con <sup>13</sup>C poco enriquecidas, con la precisión suficiente para permitir resultados de la oxidación de proteínas globales comprobados individuales, que se puedan utilizar como base para una correlación fundamentada con un estado de las proteínas individual. Por ejemplo, la medición de leucina marcada con <sup>13</sup>C solo no tiene en cuenta que la oxidación de este aminoácido esencial ni representa las características de oxidación de todos los aminoácidos en el sustrato de proteína inicial.

15 Además, el método de alto enriquecimiento de sustratos como se usa para preparar dichos sustratos de leucina marcados con <sup>13</sup>C es caro.

20 La medición de la recuperación de <sup>13</sup>C a partir de dietas de leche marcada con <sup>13</sup>C en terneros, que pertenecen al grupo de los rumiantes con un estómago y sistema de digestión muy especializados, no es adecuado para proporcionar adecuadamente los resultados para determinar cuantitativamente la oxidación de proteínas con una precisión suficientemente de cualquiera de ellos, y por lo tanto, no proporciona ninguna base para una correlación razonada con el complejo estado de las proteínas del individuo, tal como en particular en seres humanos.

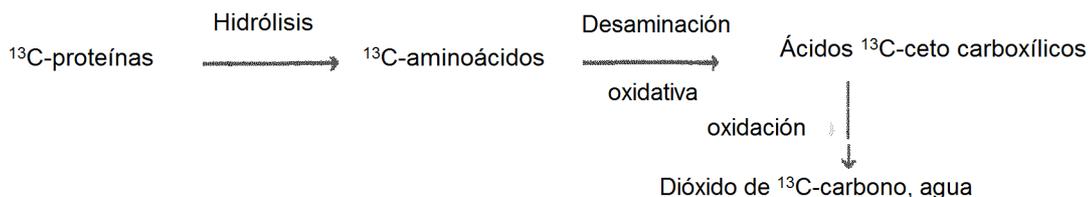
## 25 Objeto

El objetivo de la presente invención era proporcionar un método para determinar la oxidación de proteínas a partir de muestras de prueba de exhalación a <sup>13</sup>C, que evite las desventajas mencionadas anteriormente. Un objetivo particular de la presente invención era proporcionar un método simple, barato y altamente reproducible para determinar cuantitativamente la oxidación de proteínas en un individuo con un método mejorado para determinar las tasas de oxidación de proteínas individuales con una alta y mejor precisión. El método nuevo y mejorado en particular debe ser lo suficientemente preciso para permitir una correlación de la oxidación de la proteína determinada al estado de las proteínas individual. Finalmente, el nuevo método debe ser particularmente adecuado para determinar la oxidación de proteínas en muestras de mamíferos, especialmente en seres humanos.

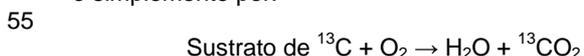
## 35 Descripción detallada de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Los inventores de la presente invención encontraron sorprendentemente que las desventajas mencionadas anteriormente pueden resolverse aplicando el nuevo método para determinar cuantitativamente la oxidación de proteínas en un individuo como se describe en el presente documento. El nuevo método resultó ser particularmente adecuado cuando se llevó a cabo con el nuevo sustrato de leche enriquecida con <sup>13</sup>C de acuerdo con la presente invención. En un aspecto, el nuevo método se basa en particular en una evaluación de la prueba de exhalación derivada de la proteína <sup>13</sup>C que utiliza un marcado general de bajo enriquecimiento de todos los aminoácidos en el sustrato subyacente de leche enriquecida con <sup>13</sup>C. Esto permite la determinación de la oxidación de proteínas en las muestras de prueba de exhalación sobre la base de todas las proteínas metabolizadas y, por lo tanto, refleja el destino metabólico final de todos los aminoácidos en lugar de solo en proteínas de la leche marcadas con leucina <sup>13</sup>C, lo que permite una correlación razonada con el estado de las proteínas individual.

50 El proceso de oxidación de proteínas, que es el proceso metabólico subyacente del método de la presente invención, se puede ilustrar de la siguiente manera:



o simplemente por:



Ahora, la exhalación de un individuo contiene todo tipo de metabolitos de los cuales el CO<sub>2</sub> es un componente

importante. El CO<sub>2</sub> se forma cuando se oxida un sustrato. La exhalación, que incluye el CO<sub>2</sub>, puede ser capturada y analizada. Al utilizar un sustrato enriquecido con <sup>13</sup>C, el CO<sub>2</sub> producido posteriormente también se enriquecerá con <sup>13</sup>C.

5 Como se ha mencionado anteriormente, la cantidad de CO<sub>2</sub> enriquecido con <sup>13</sup>C se puede medir por métodos convencionales utilizando la espectrometría de masas por relación isotópica (IRMS). Con ello, puede seguirse la oxidación de un sustrato a lo largo del tiempo de manera no invasiva, tanto para la tasa de oxidación como para la oxidación total. En la práctica, este método es una herramienta de detección útil para pacientes (frágiles) que tienen un trastorno metabólico (relacionado) o también para niños, para los cuales las muestras de sangre son demasiado invasivas y engorrosas. En un nivel fundamental, se puede hacer una comparación entre diferentes sustratos, así como una comparación de las tasas de oxidación entre diferentes sujetos (individuos) y también es posible la comparación de sujetos activos frente a no activos. Finalmente, los resultados se pueden correlacionar para proporcionar el estado de las proteínas de un individuo.

15 Existen varias técnicas para la preparación de sustratos enriquecidos con <sup>13</sup>C en general. Una opción conocida para la producción de sustratos enriquecidos con <sup>13</sup>C es el cultivo de material vegetal en un ambiente rico en <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, también conocido como marcaje de alto enriquecimiento general. Sin embargo esta opción es bastante cara. Otra opción conocida es alimentar a los animales con plantas que están enriquecidas de forma natural en <sup>13</sup>C, que en consecuencia da lugar a un animal enriquecido con <sup>13</sup>C, también conocido como procedimiento general de marcaje de bajo enriquecimiento. Las plantas de cultivo enriquecidas con <sup>13</sup>C adecuadas son las denominadas plantas C<sub>4</sub> de origen natural (o plantas CAM) que tiene un naturales contenido de <sup>13</sup>C de aproximadamente el 1,095 %. Ejemplos de plantas C<sub>4</sub> son maíz, caña de azúcar, sorgo, mijo y piña.

25 Para comparación, los cultivos pobres en <sup>13</sup>C o las plantas de cultivo del grupo de las denominadas plantas C<sub>3</sub> tienen un contenido natural de <sup>13</sup>C de aproximadamente el 1,082 %. Ejemplos de plantas C<sub>3</sub> son el trigo, centeno, avena, arroz, pasto y heno.

30 Al alimentar, por ejemplo, las vacas con maíz (del grupo de plantas C<sub>4</sub>) proporciona leche y carne enriquecida con <sup>13</sup>C, ambas compuestas de proteínas, azúcares y grasas enriquecidas con <sup>13</sup>C.

Los inventores de la presente invención encontraron que el método de la invención proporciona mejores resultados en las fracciones de los sustratos lácteos usados mediante el uso de un procedimiento de bajo enriquecimiento con la alimentación de maíz además de productos de azúcar de caña.

35 Cuando se utiliza una prueba de exhalación, se necesita un sustrato adecuado de proteína inicial enriquecida con <sup>13</sup>C. El sustrato enriquecido se administra a un individuo, generalmente en forma de comida o bebida específica para la prueba. A continuación, se puede observar la oxidación de proteínas debida al metabolismo de las proteínas al recolectar muestras de análisis de respiración en varios puntos temporales predeterminados, capturando la respiración exhalada por el individuo soplando a través de una pajita en un tubo de vidrio, recipiente, vial o tubo de recolección con un tapón de rosca superior y un sello de goma en el tapón de rosca para que, después de una exhalación completa a través de la pajita, lleve la exhalación al tubo de vidrio. Finalmente, el tubo puede cerrarse herméticamente y sellarse para capturar la respiración exhalada, proporcionando así la muestra de prueba de exhalación individual. A continuación, los tubos se insertan en el espectrómetro de masas por relación isotópica para su análisis.

45 En principio, dichas pruebas de exhalación y dispositivos de prueba de exhalación ya son conocidos. Sin embargo, los inventores de la presente invención ahora han encontrado un nuevo método para determinar con mayor precisión la oxidación de proteínas en dichas muestras de prueba de exhalación.

50 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un nuevo método para determinar cuantitativamente la oxidación de proteínas en un individuo, dicho método que comprende las etapas de:

a) medir el contenido de <sup>13</sup>C en muestras de prueba de exhalación del individuo utilizando espectrometría de masas por relación isotópica (IRMS),

b) determinar la tasa de oxidación de proteínas [%] por hora a partir de dichas muestras de prueba de exhalación, aplicando la fórmula (I):

$$\text{cantidad recuperada de } ^{13}\text{C} [\%] \text{ por hora} = \text{producción de } ^{13}\text{CO}_2 [\%] \times 100/\text{dosis inicial total de } ^{13}\text{C}$$

con:

$$\text{producción de } ^{13}\text{CO}_2 [\%] = \text{cantidad de } ^{13}\text{C por muestra de prueba de exhalación} [\%] \times \text{producción de CO}_2/100;$$

con

producción de CO<sub>2</sub> [mmol/hora] = ASC × Ø CO<sub>2</sub> mmol/hora/m<sup>2</sup> de superficie corporal,  
 ASC (área superficial del cuerpo) [m<sup>2</sup>] = peso (kg)<sup>0,5378</sup> × longitud (cm)<sup>0,3964</sup> × 0,024265,

y

5

Ø CO<sub>2</sub> mmol/hora/m<sup>2</sup> de superficie corporal = promedio de producción de CO<sub>2</sub> del individuo;

y

dosis inicial total de <sup>13</sup>C = (cantidad de proteína disponible (mg) ×  
 número ponderado de marcadores de <sup>13</sup>C ×  
 (enriquecimiento – 13Cbásico [%]))/(100 × peso molecular ponderado de  
 aminoácidos (MWsustrato de prueba [g/mol]));

10

en el que la dosis inicial total de <sup>13</sup>C se obtiene de un sustrato de leche natural enriquecido con <sup>13</sup>C aislado.

En la presente invención, "Ø" se refiere al valor medio de la producción promedio de CO<sub>2</sub> de un individuo.

15

Preferiblemente, dicho sustrato de leche enriquecida con <sup>13</sup>C aislada natural se obtiene de vacas que han sido alimentadas con maíz y caña de azúcar de enriquecidos forma natural con <sup>13</sup>C.

En él, las muestras de prueba de exhalación según la etapa a) se pueden obtener, por ejemplo, en las condiciones que se explican en detalle en los ejemplos a continuación. La medición del contenido de <sup>13</sup>C en dichas muestras de prueba de exhalación se puede llevar a cabo utilizando métodos de IRMS convencionales.

20

De ello, aplicando la fórmula (I)

Cantidad recuperada de <sup>13</sup>C [%] por hora = producción de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> [%] × 100/dosis inicial total de <sup>13</sup>C

25

Se puede determinar la tasa de oxidación de proteínas del individuo [%] por hora.

En la fórmula (I) del método según la presente invención, se considera la relación de producción de CO<sub>2</sub> del individuo [%] en un punto dado en el tiempo, reflejado por el valor

30

producción de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> [%] = cantidad de <sup>13</sup>C por muestra de prueba de exhalación [%] × producción de CO<sub>2</sub>/100

Este valor refleja la producción normalizada de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> del individuo. Esto significa que, de la producción de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, determinada a través de la prueba de exhalación, se ha eliminado la producción de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> que se produce de forma natural en un individuo.

35

En ese caso, la producción de CO<sub>2</sub> del individuo se refleja en el valor

producción de CO<sub>2</sub> [mmol/hora] = ASC × Ø CO<sub>2</sub> mmol/hora/m<sup>2</sup> de superficie corporal

40

Para calcular este valor, es necesario considerar cuánto CO<sub>2</sub> producirá el individuo (mmol/h). Se estima que, por ejemplo, un individuo humano promedio en reposo tiene una producción de CO<sub>2</sub> de 300 mmol/h/m<sup>2</sup> de superficie corporal. Por lo tanto, cuando se aplica el método de la presente invención a individuos humanos, que es una realización preferida de la presente invención, el valor Ø CO<sub>2</sub> mmol/h/m<sup>2</sup> de superficie corporal es de 300 mmol/h/m<sup>2</sup> de superficie corporal.

45

Además, para determinar con precisión la oxidación de la proteína individual, se debe considerar el área de la superficie corporal (ASC) del individuo, que se puede calcular de acuerdo con la fórmula de Haycock (Haycock GB, Schwartz GJ, Wisotsky DH "Geometric method for measuring body surface area: A height-weight formula validated in infants, children and adults" J Pediatr 1978, 93:62-66) sobre la base de la medición del peso y la longitud del individuo según la fórmula

50

ASC = peso (kg)<sup>0,5378</sup> × longitud (cm)<sup>0,3964</sup> × 0,024265

55

Por consiguiente, cuando se aplica el método de la presente invención a un individuo humano, la producción de CO<sub>2</sub> (mmol/h) del individuo humano es ASC × 300.

La determinación de la producción relativa de CO<sub>2</sub> del individuo [%] en un punto dado en el tiempo refleja además la cantidad de <sup>13</sup>C por muestra de prueba de exhalación [%], que se determina a partir del contenido de <sup>13</sup>C de la IRMS medido en la muestra de prueba de exhalación.

60

Para determinar la tasa de oxidación de la proteína del individuo de acuerdo con la fórmula (I) de la presente invención, debe considerarse además cuánto <sup>13</sup>C se ha ofrecido en total y, por lo tanto, en principio se ha puesto a

disposición para el proceso de digestión de la proteína. A continuación, debe calcularse el porcentaje de la dosis inicial total de  $^{13}\text{C}$  (mmol) que se convierte (oxida) en  $^{13}\text{CO}_2$  (% de dosis/h) en un cierto tiempo para proporcionar valores precisos para la oxidación de la proteína. Esto significa que debe considerarse la dosis inicial total de  $^{13}\text{C}$  que se ha ofrecido, por ejemplo, a través del sustrato enriquecido con  $^{13}\text{C}$  inicial o una comida de prueba enriquecida con  $^{13}\text{C}$ , que puede determinarse mediante la fórmula

$$\text{dosis inicial total de } ^{13}\text{C} = \frac{\text{cantidad de proteína disponible (mg)} \times \text{número ponderado de marcadores de } ^{13}\text{C} \times \text{enriquecimiento} - ^{13}\text{C}_{\text{básico}} [\%]}{(100 \times \text{peso molecular ponderado de aminoácidos (MW}_{\text{sustrato de prueba}} [\text{g/mol}])};$$

En este caso, el término  $^{13}\text{C}_{\text{básico}}$  indica el enriquecimiento basal de  $^{13}\text{C}$ , lo que significa el enriquecimiento de  $^{13}\text{C}$  de origen natural en el punto temporal cero ( $t = 0$ ). Cada individuo contiene una cierta cantidad natural de isótopos  $^{13}\text{C}$  a  $t = 0$ . Esta cantidad natural de  $^{13}\text{C}$  tiene que ser sustraída de la cantidad de  $^{13}\text{C}$  del sustrato enriquecido para normalizar el valor de enriquecimiento de  $^{13}\text{C}$ .

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para determinar la tasa acumulada total de la oxidación de proteínas [%] en un punto temporal ( $t_x$ ) mediante la integración de la tasa de oxidación de proteínas [%] derivada de la fórmula (I) como se ha explicado anteriormente. La tasa de oxidación total acumulada de proteína [%] en un punto temporal ( $t_x$ ) se puede derivar aplicando la fórmula (II)

$$\text{cantidad total recuperada de } ^{13}\text{C} [\%] \text{ a } t_x = \text{dosis acumulada de } ^{13}\text{C} [\%] \text{ a } t_{x-1} + ((t_x - t_{x-1})/60) \times ((\text{cantidad recuperada de } ^{13}\text{C} [\%] \text{ por hora a } t_x/2) + (\text{cantidad recuperada de } ^{13}\text{C} [\%] \text{ por hora a } t_{x-1}/2))$$

En ese caso, el valor [cantidad recuperada de  $^{13}\text{C}$  [%] por hora] se determina de acuerdo con la fórmula (I) como se ha explicado anteriormente.

Esta tasa de oxidación de proteínas acumulada refleja la integración de todas las tasas de oxidación de proteínas en ciertos puntos temporales, excretadas en todos los segmentos muy pequeños en este período. Por lo tanto, se puede calcular la cantidad total de  $^{13}\text{C}$  exhalado en un momento dado y se puede mostrar como porcentaje de la dosis de  $^{13}\text{C}$  ofrecida inicialmente.

Como se ha mencionado anteriormente, la determinación de la producción relativa de  $\text{CO}_2$  de un individuo [%] en un punto dado en el tiempo se calcula sobre la base de la cantidad medida de  $^{13}\text{C}$  por muestra de prueba de exhalación [%]. La presencia de  $^{13}\text{C}$  en una muestra generalmente se da como una relación  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ . La relación  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$  de las muestras de prueba de exhalación generalmente se compara con la relación  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$  de un patrón internacional y la diferencia se indica como 'delta' ( $\delta$ ). Como las diferencias en las proporciones de las muestras de prueba de exhalación y el patrón internacional son tan pequeñas, se expresan en desviación en 'partes por mil' (‰) del patrón. Para el carbono esta diferencia se refleja en la fórmula

$$\delta \text{ de } ^{13}\text{C}_{\text{muestra}} = [(\text{relación}_{\text{muestra}} ^{13}\text{C}:^{12}\text{C})/(\text{relación}_{\text{patrón}} ^{13}\text{C}:^{12}\text{C}) - 1] \times 1000$$

En este caso, el patrón se define como 0. Para el carbono, el patrón internacional es Pee Dee Belemnite (PDB), una formación de carbono que tiene la relación absoluta de  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$  generalmente aceptada de 0,0112372.

Todos los valores de  $^{13}\text{C}$  medidos por IRMS se devuelven directamente como valores ' $\delta$ ', que luego se relacionan con el patrón PDB de acuerdo con la fórmula

$$\text{Relación } ^{13}\text{C}:^{12}\text{C} = ((\delta \text{ } ^{13}\text{C}/1000) + 1) \times 0,0112372$$

Por consiguiente, en un aspecto adicional de la invención, la cantidad de  $^{13}\text{C}$  por muestra de prueba de exhalación [%], reflejada en la fórmula (I) anterior, se puede determinar aplicando la fórmula (III)

$$\text{cantidad de } ^{13}\text{C} \text{ por muestra de prueba de exhalación} [\%] = (\text{relación}_{\text{muestra}} ^{13}\text{C}:^{12}\text{C}/\text{relación}_{\text{muestra}} ^{13}\text{C}:^{12}\text{C} + 1) \times 100;$$

con

$$\text{relación}_{\text{muestra}} ^{13}\text{C}:^{12}\text{C} = ((\delta \text{ } ^{13}\text{C}_{\text{muestra}} /1000) + 1) \times \delta \text{ } ^{13}\text{C}_{\text{patrón}},$$

en la que  $\delta \text{ } ^{13}\text{C}_{\text{patrón}}$  es el patrón internacional para Pee Dee Belemnite (PDB) de carbono, que tiene una relación absoluta de  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$  de 0,0112372.

El método de la presente invención es adecuado para determinar la oxidación de proteínas en un individuo, en el que, en el contexto de la presente invención, el término "individuo" incluye cualquier individuo o sujeto vivo, en particular mamíferos. Específicamente, el método de la presente invención es adecuado para determinar la

oxidación de proteínas en mamíferos, que se seleccionan del grupo de mamíferos monogástricos, tales como omnívoros, carnívoros y herbívoros, por ejemplo seres humanos, perros, cerdos, ratas, gatos, caballos, y conejos. Los mamíferos monogástricos tienen un estómago simple de una sola cámara. En contraste, los mamíferos rumiantes, como una vaca, una cabra u oveja, tienen un estómago complejo de cuatro cámaras. Muy particularmente, el "individuo" es un individuo humano, aunque los caballos (especialmente los caballos de raza) también son individuos preferidos. Por consiguiente, se prefiere particularmente llevar a cabo el método de la presente invención con muestras de ensayo de exhalación, que se obtienen de un individuo humano.

Los individuos humanos en el sentido de la presente invención comprenden todos los tipos de seres humanos tales como hombres, mujeres, ancianos, adultos, adolescentes, niños, bebés, recién nacidos, individuos con mayores demandas físicas, tales como, en particular, atletas, astronautas, individuos con digestión y nutrición en desequilibrio o alteradas como, por ejemplo, personas mal nutridas o desnutridas, individuos que comen selectivamente, por ejemplo debido a dietas, vegetarianos, veganos, seres humanos que sufren de incompatibilidades o intolerancias alimentarias o alergias alimentarias, individuos que comen selectivamente debido a invalidez física o enfermedad, alimentación selectiva de individuos debido a funciones orgánicas defectuosas, disfunciones orgánicas, por ejemplo, debido a deficiencias en el sistema digestivo, debido a quimioterapias o cualquier otra deficiencia relacionada con el sistema digestivo, que pueden influir en la digestión normal, individuos que sufren sarcopenia o que están obligados a estar en cama (reposo en cama), individuos con trastornos del metabolismo muscular, etc. Los individuos humanos de particular interés son personas de edad avanzada, niños, bebés, recién nacidos e individuos con mayores demandas físicas como atletas, astronautas, personas con digestión y nutrición en desequilibrio o alteradas, personas mal nutridas o desnutridas, personas que comen de forma selectiva, personas que sufren de incompatibilidades o intolerancias alimentarias o alergias alimentarias, personas que padecen sarcopenia o están obligados a estar en cama e individuos con alteraciones relacionadas con el metabolismo muscular.

Como se ha mencionado anteriormente, el método de la presente invención puede ser particularmente adecuado para determinar un estado de las proteínas individual. En este contexto, en un aspecto adicional, el método de la invención comprende además una o más de las etapas

- determinar la oxidación de proteínas en un individuo bajo diferentes condiciones físicas,
- determinar la constitución física general del individuo.
- determinar la actividad física promedio o el esfuerzo físico del individuo,
- determinar el estado de las proteínas del individuo sobre la base de los valores de oxidación de la proteína derivada,
- determinar la oxidación de proteínas y el estado de las proteínas de los bebés para determinar el estado nutricional,
- elegir una nutrición adecuada para el individuo según el estado de las proteínas determinado en consideración de su constitución física general y el esfuerzo físico, y
- dar consejos nutricionales para las distintas categorías, en particular para prevenir o contrarrestar la desnutrición y la desnutrición, así como también consejos nutricionales (programación metabólica) para los bebés para prevenir o contrarrestar la obesidad y el desarrollo de cáncer en la vida adulta.

El método de la presente invención permite el análisis de diferencias cuantitativas en el comportamiento metabólico de diversas proteínas en seres humanos, en particular bajo diversas condiciones físicas. Los datos permiten un análisis adicional de la competencia de sustratos de macronutrientes en individuos, que se pueden usar adecuadamente en la determinación de las recomendaciones de ingesta de proteínas en diversas condiciones metabólicas. Finalmente, los datos permiten la estimación del estado de una proteína individual en diversas condiciones metabólicas.

La correlación adecuada de los datos de oxidación de proteínas obtenidos por el método de la presente invención en particular, en combinación con datos individuales adicionales, además puede permitir la estimación de un índice de masa muscular.

La estimación de un índice de masa muscular puede ser particularmente adecuada, por ejemplo, en condiciones físicas relacionadas con la pérdida de masa muscular, por ejemplo durante el envejecimiento (miopatía) que da lugar a inmovilidad, durante condiciones clínicas, debido a una nutrición no óptima, durante viajes espaciales, así como en condiciones físicas relacionadas con el aumento de la masa muscular, por ejemplo durante el entrenamiento deportivo (por ejemplo, monitorización del aumento del rendimiento) o aumento de la masa muscular en bebés (por ejemplo, monitorización del desarrollo y la nutrición adecuados).

Como se ha mencionado anteriormente, el nuevo método de la presente invención se puede llevar a cabo de

manera particularmente adecuada utilizando muestras de prueba de exhalación, en la que la dosis inicial total de  $^{13}\text{C}$  se obtiene de un sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural.

5 Preferiblemente, dicho sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural se selecciona de al menos uno del grupo que consiste en proteína total de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada, suero de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada, caseína marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada, y proteínas de la leche individuales marcadas con  $^{13}\text{C}$  aislada, o cualquiera de sus mezclas. Preferiblemente, dicho sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural es un sustrato de leche poco enriquecido. Más preferiblemente, dicho sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural es un sustrato de leche poco enriquecido, obtenido de vacas que han sido alimentadas con maíz de forma natural enriquecido con  $^{13}\text{C}$  en combinación con caña de azúcar.

15 El término "proteína total de la leche" significa las proteínas totales aisladas de una leche bovina normal, que en promedio está contenida en una cantidad de aproximadamente 30 a 35 gramos de proteínas por litro. Alrededor del 80 % de las proteínas de la leche están dispuestas en micelas de caseína, que forman las estructuras más grandes en la porción líquida de la leche normal y que forman agregados de varios miles de moléculas de proteína. La proteína total de la leche en particular comprende las subfracciones de proteína caseína y suero de la leche (aproximadamente 80 % de caseína y 20 % de suero de la leche).

20 La caseína en el sentido de la presente invención significa caseína aislada y se refiere a un tipo de sub-fracción de la proteína de la leche total, que comprende varios tipos diferentes de proteínas de caseína (individuales), como en particular los cuatro tipos principales  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\kappa$ -caseína. En conjunto, las proteínas de caseína representan alrededor del 76 al 86 % en peso del contenido total de proteínas en la leche normal. La mayoría de las proteínas de caseína están unidas a las micelas de caseína.

25 El suero en el sentido de la presente invención significa en particular suero aislado y se refiere a otro tipo de subfracción de la proteína total de la leche. Las proteínas del suero son más solubles en agua que las caseínas y no forman estructuras más grandes. Debido a que las proteínas permanecen suspendidas en el suero de la leche que queda atrás cuando las caseínas se coagulan hasta formar cuajos, se conocen colectivamente como proteínas del suero. Las proteínas del suero constituyen aproximadamente el 20 % en peso del contenido total de proteínas en la leche. La lactoglobulina es la proteína del suero más común.

Además, la leche contiene docenas de otros tipos de proteínas, además de las caseínas y las proteínas del suero, incluidas en particular varias enzimas.

35 Proteína de leche individual en el sentido de la presente invención significa en particular proteínas individuales aisladas, que están presentes en particular en las sub-fracciones de caseína y suero de la leche o en la leche normal.

40 Los ejemplos de proteínas individuales comprenden  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína, lactoglobulina, como la  $\beta$ -lactoglobulina, lactoalbúmina, albúmina sérica y lactoferrina.

45 Particularmente preferido es un método de acuerdo con la presente divulgación en el que el sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural es la proteína total de la leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislado, suero de la leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislado, caseína enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada o proteína de la leche individual enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada (con las proteínas de la leche individuales como se ha definido anteriormente), que están en forma de un polvo seco, preferiblemente un polvo secado por pulverización. Preferiblemente, dicho sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural es un sustrato de leche poco enriquecido. Más preferiblemente, dicho sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural es un sustrato de leche poco enriquecido, obtenido de vacas que han sido alimentadas de forma natural con maíz enriquecido de forma natural con  $^{13}\text{C}$  en combinación con caña de azúcar.

50 Más preferido es un método de acuerdo con la presente divulgación en el que la dosis inicial total de  $^{13}\text{C}$  se obtiene de una dosis de hasta aproximadamente 70 g, preferiblemente de una dosis de hasta aproximadamente 50 g, más preferiblemente de una dosis de hasta aproximadamente 30 g del sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural como se ha definido anteriormente.

55 Un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a dicho nuevo sustrato particularmente adecuado de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural, que es la proteína total de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada natural, suero de la leche marcado con  $^{13}\text{C}$  aislada natural, caseína marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada o una proteína de la leche individual marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada natural, cada uno como se ha definido anteriormente, en forma de polvo seco, en particular en forma de polvo secado por pulverización. Preferiblemente, dicho nuevo sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural es un sustrato de leche poco enriquecido. Más preferentemente, dicho sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural es un sustrato de leche poco enriquecido, obtenido de vacas que han sido alimentadas con maíz de forma natural enriquecido con  $^{13}\text{C}$  en combinación con caña de azúcar.

65 Preferiblemente, el sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural es la proteína total de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada natural o suero de la leche marcado con  $^{13}\text{C}$  aislada natural, o una proteína de la leche individual

marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada natural, cada una como se ha definido anteriormente.

5 El aislamiento de las fracciones de proteínas marcadas con  $^{13}\text{C}$  respectivas o las proteínas de una leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  y el secado, como el secado por pulverización, se puede llevar a cabo mediante técnicas convencionales para separar y secar fracciones de leche respectivas (no marcadas).

10 El nuevo sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada de acuerdo con la presente invención es particularmente adecuado para llevar a cabo el método de la presente invención, ya que se caracteriza por tener los siguientes valores promedio ponderados estimados por molécula:

proteína total de la leche:	promedio ponderado del peso molecular de los aminoácidos de aproximadamente 131,37 g/mol; promedio ponderado del número de átomos de C de los aminoácidos de aproximadamente 5,13; y enriquecimiento en $^{13}\text{C}$ de aproximadamente 1,09561
suero:	promedio ponderado del peso molecular de los aminoácidos de aproximadamente 130,50 g/mol; promedio ponderado del número de átomos de C de los aminoácidos de aproximadamente 5,01; y enriquecimiento en $^{13}\text{C}$ de aproximadamente 1,09561
caseína:	promedio ponderado del peso molecular de los aminoácidos de aproximadamente 131,52 g/mol; promedio ponderado del número de átomos de C de los aminoácidos de aproximadamente 5,15; y enriquecimiento en $^{13}\text{C}$ de aproximadamente 1,09561

15 Normalmente, en estudios de isótopos se usa un sustrato bien definido, por ejemplo, glucosa. La glucosa es una molécula con valores claros para el peso del sustrato (g/mol) y el número de átomos de carbono. Para llevar a cabo el método de la presente invención, se requiere un valor para el peso del sustrato de leche inicial respectivo, así como el valor para la cantidad de átomos de carbono del sustrato de leche, por ejemplo, la caseína. Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, la proteína total de la leche, la caseína y el suero de la leche son una colección de proteínas diferentes, cada una con una composición de aminoácidos diferente y, por lo tanto, una masa diferente y un número diferente de átomos de carbono. Al considerar las siete proteínas de la leche más abundantes en las fracciones de proteína respectivas, por ejemplo la caseína, se puede explicar más del 90 % de las proteínas de la  
 20 fracción de proteína respectiva. Para estas siete proteínas más abundantes, se determinó el contenido de aminoácidos (por ejemplo, mediante análisis con métodos conocidos o mediante el cálculo de los valores de base de datos comúnmente disponibles) y para cada una de dichas siete proteínas se calcularon un peso molecular promedio ponderado de aminoácidos y un número ponderado de átomos de carbono. En base a esto, se determinó un peso molecular promedio ponderado de aminoácidos y un número promedio ponderado de átomos de carbono  
 25 como se ha indicado anteriormente.

Particularmente preferido es el método de acuerdo con la presente invención, en el que la dosis inicial total de  $^{13}\text{C}$  se deriva del nuevo sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural tal como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, la dosis total inicial de  $^{13}\text{C}$  se deriva del nuevo sustrato de la leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural que es proteína total de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada natural o suero de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada natural, o una proteína de la leche individual marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada natural, más preferiblemente dicho sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural se deriva mediante un método de bajo enriquecimiento, aún más preferido, se obtiene de vacas que han sido alimentadas con maíz enriquecido con  $^{13}\text{C}$  de forma natural en combinación con la caña de azúcar.  
 35

La invención se ilustra con más detalle mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos simplemente constituyen ejemplos, y el experto en la materia es capaz de extender los ejemplos específicos a otras realizaciones para las que se busca protección.

40 **Descripción de las figuras**

- Fig. 1a: Cinética de oxidación promedio de 30 g de proteína total de la leche disuelta en 500 ml de agua (n = 6).
- Fig. 1b: Promedio de oxidación acumulada de 30 g de proteína total de la leche disuelta en 500 ml de agua (n = 6).
- 45 Fig. 2a: Cinética de oxidación de la proteína total de la leche administrada en diferentes dosis
- Fig. 2b: Oxidación acumulada de la proteína total de la leche administrada en diferentes dosis.
- Fig. 3: Cinética de oxidación de  $^{13}\text{CO}_2$  de 2 sustratos; línea roja: suero de la leche (rápido) y línea verde: caseína (lenta)
- Fig. 4: Diferentes sustratos dan como resultado diferentes cinéticas de oxidación.
- 50 Fig. 5a: Cinética de oxidación de  $^{13}\text{CO}_2$  de la proteína total de la leche en 3 circunstancias diferentes; línea azul: 30 g de proteína total de la leche durante el reposo, línea gris: 30 g de proteína total de la leche durante el reposo después de 3 días de dieta de restricción de proteínas (~10 g/día) antes de la prueba, línea naranja: 30 g de proteína total de la leche durante el reposo después de 3 días de proteína dieta de restricción (~10 g/día) antes de la prueba más 1 hora, nadar 3 km la mañana antes de la prueba
- 55 Fig. 5b: La oxidación de  $^{13}\text{CO}_2$  acumulativa de la proteína total de la leche en 3 circunstancias diferentes; línea azul: 30 g de proteína total de la leche durante el reposo, línea gris: 30 g de proteína total de la leche durante el reposo después de 3 días de dieta de restricción de proteínas (~10 g/día) antes de la prueba,

línea naranja: 30 g de proteína total de la leche durante el reposo después de 3 días de dieta de restricción de proteínas (~10 g/día) antes de la prueba más 1 hora, nadar 3 km la mañana antes de la prueba

Fig. 6: Comparación del punto final relativo ( $t = 330$ ) de 30 g de oxidación de proteína total de la leche en diferentes circunstancias; azul (100 %): oxidación total de proteínas de la leche durante el reposo, naranja: 30 g de proteína total de la leche durante el reposo después de 3 días de dieta de restricción de proteínas (~10 g/día) antes de la prueba, amarillo: 30 g de proteína total de la leche durante el reposo después de 30 minutos de biciclite (~130 lpm, 135 vatios, 80 rpm) la mañana antes de la prueba, gris: 30 g de proteína total de la leche durante el reposo después de 3 días de dieta de restricción de proteínas (~10 g/día) antes de la prueba más 1 hora, nadar 3 km la mañana antes de la prueba

## Ejemplos

### I. Sustrato de leche

El sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  se preparó restringiendo el alimento de las vacas a una combinación de maíz y caña de azúcar para obtener leche marcada con  $^{13}\text{C}$  de forma natural, con un valor  $\delta$  de  $^{13}\text{C}$  de 14,21. La leche marcada con  $^{13}\text{C}$  (entera) se separó en 5 fracciones de leche diferentes, como proteína total de la leche, suero de la leche, caseína, lactosa y grasa de leche. La proteína total de la leche, suero de la leche, caseína y la fracción de lactosa se secaron usando secado por pulverización y se proporciona como un polvo de proteína total de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada, suero de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada, caseína marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada y lactosa marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada.

### II. Prueba de exhalación

#### II.1. Preparación de la sustrato inicial enriquecido con $^{13}\text{C}$ (comida de prueba enriquecida con $^{13}\text{C}$ )

El polvo de sustrato de leche marcado con  $^{13}\text{C}$  respectivo se disuelve en agua. Una dosis de 30 g del polvo de sustrato de leche se disuelve en 500 ml de agua.

#### 11.2. Prueba de exhalación

##### 2.1 Día(s) antes de la prueba de exhalación

La prueba de exhalación se realizó con voluntarios humanos adultos.

Para mantener el nivel de  $^{13}\text{C}$  en cada sujeto de prueba lo más bajo posible, el consumo de productos  $^{13}\text{C}$  enriquecidos de forma natural debe eliminarse dos días antes de la prueba.

Para minimizar la influencia del ejercicio/deportes en el resultado del sustrato de prueba, independientemente de que el sustrato dado se oxide o se almacene, debe evitarse el ejercicio/deportes 1 día antes de la prueba y durante la prueba.

Para llegar sobrio al día de la prueba, el consumo de alimentos y bebidas debe detenerse a partir de las 22:00 de la noche anterior a la prueba. También debe evitarse el desayuno en el día de la prueba. Se permitía beber agua o café sin azúcar y/o leche.

##### 2.2 Día de la prueba

Las muestras de respiración basal se toman unos minutos antes del consumo de la comida de prueba inicial (es decir, en forma de bebida de prueba de 30 gramos del sustrato de prueba marcado con  $^{13}\text{C}$  deseado + 500 ml de agua para diluir el sustrato de prueba). La bebida de prueba se consume a las 09:15 en 5 minutos y se toman muestras de respiración desde las 09:25 cada 10 minutos hasta las 14:45. Si un sujeto de prueba no pudo posponer comer o beber hasta las 14:45, se hizo una nota del momento y el tipo de consumo.

Se anotan todas las desviaciones en el tiempo de toma de muestras en comparación con el calendario.

##### 2.3 Toma de muestras

Las muestras de respiración se recogen en los denominados contenedores de respiración. Estos recipientes de respiración consisten en un tubo de vidrio con un tapón de rosca superior que tiene un sello de goma.

El sujeto de prueba abre el recipiente e inserta una pajita en el recipiente de vidrio casi hasta el fondo. El sujeto respira bien y sopla a través de la pajita en el recipiente de respiración soplando profundamente. Inmediatamente después de la exhalación, la tapa se enrosca de nuevo. Cuanto más tarde en enroscar la tapa, más aire expulsado se perderá del recipiente de toma de muestras.

Las muestras de respiración se miden idealmente lo antes posible, sin embargo, las muestras tienen una vida útil de almacenamiento de al menos 4 semanas.

#### 2.4 Medición de IRMS

- 5 La cantidad de  $^{13}\text{C}$  en las muestras de respiración recolectadas se mide utilizando métodos y dispositivos de IRMS convencionales.

### III. Resultados

- 10 De acuerdo con los valores delta de  $^{13}\text{C}$  derivados de IRMS medidos, se determinaron la tasa de oxidación de la proteína y la oxidación de la proteína acumulada de acuerdo con la presente invención.

#### 111. 1 Oxidación de proteínas de la leche: Cinética y acumulada

- 15 La Figura 1a muestra la cinética de oxidación promedio de 30 g de proteína total de la leche disuelta en 500 ml de agua durante 330 minutos (6 repeticiones en 1 sujeto). La oxidación máxima ( $\pm$  desviación típica, SD) se alcanza a los 120 minutos después de la ingestión (7,24 % ( $\pm$  1,54 %)). El ascenso es más rápido que el descenso. A los 330 minutos la oxidación no ha vuelto a los niveles de referencia.

- 20 La Figura 1b muestra la oxidación acumulada de 30 g de proteína total de la leche disuelta en 500 ml de agua durante 330 minutos (6 repeticiones). En el punto final (t = 330 minutos), el 24,18 % ( $\pm$  3,37 %) de la dosis dada se recupera como  $^{13}\text{CO}_2$  y, por lo tanto, se oxida.

#### III.2 Diferentes dosis de proteínas totales de la leche

- 25 La Figura 2a muestra los resultados de la cinética de oxidación de diferentes dosis de proteínas de la leche total que van desde 10 g hasta 70 g. Las curvas de 10 a 50 g son comparables, sin embargo, la dosis de 70 g da como resultado a una parte que asciende más lentamente con flujos hacia una meseta en lugar de un pico claro.

- 30 La Figura 2b muestra la oxidación acumulada de la proteína total de la leche. En el punto final (330 minutos), la cantidad oxidada es similar para dosis de 10, 30 y 50 g. La dosis de 70 g muestra un menor valor de oxidación.

#### III.3 Perfiles de oxidación de suero y caseína (Análisis de respiración frente a análisis de sangre)

- 35 Boirie et al. 1997 midió la aparición de suero de la leche con  $^{13}\text{C}$  y de caseína con  $^{13}\text{C}$  en sangre a través de la leucina marcada con  $^{13}\text{C}$ . Estos resultados sirvieron como plantilla para lo que se puede esperar cuando se mide la aparición de  $^{13}\text{C}$  en  $^{13}\text{CO}_2$  de la respiración exhalada. Boirie et al. descubrieron que el suero de la leche aparece rápidamente en comparación con la caseína y tiene un pico claro en la tasa de oxidación. Sin embargo, la caseína forma una meseta rápidamente y después de 5 horas comienza a disminuir lentamente en comparación con la tasa de disminución observada en la señal del suero. Según estas observaciones, las proteínas se clasifican como proteínas "lentas" o "rápidas".

- 45 Como se muestra en la Figura 3, el suero y la caseína se dieron en ocasiones separadas. Cada sustrato se administró a una dosis de 30 g diluida en 500 ml de agua. De acuerdo con los hallazgos de Boirie et al. 1997, el suero de la leche debe producir una curva con un rápido aumento en la tasa de oxidación que termina en un pico, después del cual la tasa de oxidación debería disminuir. En comparación, la caseína debería producir una curva con un aumento lento de la tasa de oxidación en una meseta que disminuye lentamente.

#### III.4 Oxidación de diferentes sustratos (suero de la leche, caseína, grasa de la leche y lactosa)

- 50 La Figura 4 muestra los resultados de diferentes sustratos: suero de la leche, caseína, proteína total de la leche, grasa de la leche y lactosa. Sorprendentemente, el suero de la leche se oxida más rápido que la lactosa. Se observa una clara diferencia en la cinética entre el suero de la leche y la caseína, donde el suero alcanza su punto máximo rápidamente y luego disminuye hasta casi la línea basal. Sin embargo, la caseína asciende lentamente, forma una meseta y disminuye lentamente hacia la línea basal. La proteína total de la leche, que consiste en el 80 % de caseína y el 20 % de suero, se comporta principalmente como la caseína, aunque la proteína total de la leche tiene un pico ligeramente más alto que la caseína. La grasa de la leche se oxida más lentamente, se alcanza un pico aplanado entre 4 y 5 horas.

- 60 En el punto final (330 minutos), la cantidad oxidada es la misma para el suero y la lactosa (30 a 35 %). También la caseína, la proteína total de la leche y la grasa de la leche se agrupan en el punto final (22 a 26 %).

#### 111.5 Dieta normal frente a dieta restringida en proteínas

- 65 La Figura 5a muestra la cinética de oxidación de 30 g de proteína total de la leche en diferentes circunstancias. En azul se da la oxidación en condiciones normales de reposo. En gris se da la oxidación con una dieta de restricción

de proteínas 3 días antes del experimento (~10 g/día). La línea de oxidación naranja también tiene 3 días de restricción de proteínas más nadar durante 1 hora 3 km la mañana antes de la prueba. La cinética de oxidación cambia claramente al aumentar la severidad de la intervención. La parte ascendente de todas las líneas es similar, pero la parte descendente es diferente, con la línea naranja que incluso pasa el nivel de referencia.

5 La Figura 5b muestra las curvas acumulativas con una clara separación desde el punto temporal 120 minutos. La proteína total de la leche sin ninguna intervención muestra la oxidación más alta en el punto final, seguida de la proteína total de la leche con restricción de proteínas (3 días antes de la prueba, ~10/día) y con la oxidación más baja es la proteína total de la leche con restricción de proteínas más ejercicio (nadar 3 km durante 1 hora).

10 111.6 Comparación del punto final relativo

15 La Figura 6 muestra los puntos finales relativos de la proteína total de la leche con diferentes intervenciones. En comparación con ninguna intervención (azul), hay una reducción de aproximadamente el 20 % cuando se añade una dieta de restricción de proteínas (3 días, ~10 g/día) al protocolo (naranja). Se observa una reducción de aproximadamente el 40 % (amarillo) en comparación con el control con bicicleta (~130 lpm, 135 vatios, 80 rpm), sin embargo, se puede observar una gran desviación típica. Se ve una reducción del 50 % cuando la restricción de proteínas se combina con el ejercicio (nadar 3 km durante 1 hora) justo antes de la prueba.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar cuantitativamente la oxidación de proteínas en un individuo, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) medir el contenido de  $^{13}\text{C}$  en muestras de prueba de exhalación del individuo utilizando espectrometría de masas por relación isotópica (IRMS),
- b) determinar la tasa de oxidación de proteínas [%] por hora a partir de dichas muestras de prueba de exhalación, aplicando la fórmula (I):

$$\text{cantidad recuperada de } ^{13}\text{C} [\%] \text{ por hora} = \text{producción de } ^{13}\text{CO}_2 [\%] \times 100 / \text{dosis inicial total de } ^{13}\text{C}$$

con:

$$\text{producción de } ^{13}\text{CO}_2 [\%] = \text{cantidad de } ^{13}\text{C} \text{ por muestra de prueba de exhalación} [\%] \times \text{producción de CO}_2 \text{ [mmol/hora]}/100;$$

$$\text{producción de CO}_2 \text{ [mmol/hora]} = \text{ASC} \times \emptyset \text{ CO}_2 \text{ mmol/hora/m}^2 \text{ de superficie corporal,}$$

$$\text{ASC (área superficial del cuerpo) [m}^2\text{]} = \text{peso (kg)}^{0,5378} \times \text{longitud (cm)}^{0,3964} \times 0,024265,$$

$$\emptyset \text{ CO}_2 \text{ mmol/hora/m}^2 \text{ de superficie corporal} = \text{promedio de producción de CO}_2 \text{ del individuo [mmol/hora/m}^2 \text{ de superficie corporal]}$$

y

$$\text{dosis inicial total de } ^{13}\text{C} = (\text{cantidad de proteína disponible (mg)} \times \text{número ponderado de marcadores de } ^{13}\text{C} \times (\text{enriquecimiento} - ^{13}\text{C}_{\text{básico}} [\%])) / (100 \times \text{peso molecular ponderado de aminoácidos (MW}_{\text{sustrato de prueba}} \text{ [g/mol]}));$$

en donde la dosis inicial total de  $^{13}\text{C}$  se obtiene de un sustrato de la leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada de forma natural que se selecciona entre proteína total de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada, suero de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada y proteínas de la leche individuales marcadas con  $^{13}\text{C}$  aisladas que se seleccionan del grupo que consiste de lactoglobulina, lactoalbúmina, albúmina sérica y lactoferrina, preferiblemente el sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada de forma natural es suero de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la etapa c) determinar la tasa de oxidación total acumulada de proteína [%] en un punto temporal ( $t_x$ ) integrando la tasa de oxidación de proteína de acuerdo con la reivindicación 1, aplicando la fórmula (II):

$$\text{cantidad total recuperada de } ^{13}\text{C} [\%] \text{ a } t_x = \text{dosis acumulada de } ^{13}\text{C} [\%] \text{ a } t_{x-1} + ((t_x - t_{x-1})/60) \times ((\text{cantidad recuperada de } ^{13}\text{C} [\%] \text{ por hora a } t_x/2) + (\text{cantidad recuperada de } ^{13}\text{C} [\%] \text{ por hora a } t_{x-1}/2))$$

en donde el valor [cantidad recuperada de  $^{13}\text{C}$  [%] por hora] se determina de acuerdo con la fórmula (I) de la reivindicación 1.

3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el valor [cantidad de  $^{13}\text{C}$  por muestra de prueba de exhalación [%]] se obtiene de la fórmula (III):

$$\text{cantidad de } ^{13}\text{C} \text{ por muestra de prueba de exhalación} [\%] = (\text{relación}_{\text{muestra}} ^{13}\text{C}:^{12}\text{C} / \text{relación}_{\text{muestra}} ^{13}\text{C}:^{12}\text{C} + 1) \times 100;$$

con

$$\text{relación}_{\text{muestra}} ^{13}\text{C}:^{12}\text{C} = ((\delta ^{13}\text{C}_{\text{muestra}} / 1000) + 1) \times \delta ^{13}\text{C}_{\text{patrón}},$$

en la que  $\delta ^{13}\text{C}_{\text{patrón}}$  es el patrón internacional para Pee Dee Belemnite (PDB) de carbono, que tiene una relación absoluta de  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$  de 0,0112372.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la dosis inicial total de  $^{13}\text{C}$  se obtiene de un sustrato de la leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural seleccionado entre proteína total de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada, suero de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada y proteínas de la leche individual marcada con  $^{13}\text{C}$  aisladas, que se seleccionan del grupo que consiste en lactoglobulina, lactoalbúmina, albúmina sérica y lactoferrina, preferiblemente el sustrato de la leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada natural es suero de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada, en donde el sustrato de la leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada se obtiene de vacas que se han alimentado con maíz y caña de azúcar enriquecidos de forma natural con  $^{13}\text{C}$ .

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sustrato de la leche

enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada de forma natural seleccionado entre proteína total de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada, suero de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada y proteínas de la leche individuales marcadas con  $^{13}\text{C}$  aisladas que se seleccionan del grupo que consiste en lactoglobulina, lactoalbúmina, albúmina sérica y lactoferrina, siendo preferiblemente suero de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada, está en forma de polvo seco.

5 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada de manera natural es proteína total de la leche o suero de la leche, que tiene los siguientes valores promedio ponderados por molécula:

10 proteína total de la leche: promedio ponderado del peso molecular de los aminoácidos de aproximadamente 131,37 g/mol; promedio ponderado del número de átomos de C de los aminoácidos de aproximadamente 5,13; y enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  de aproximadamente 1,09561  
 suero: promedio ponderado del peso molecular de los aminoácidos de aproximadamente 130,50 g/mol; promedio ponderado del número de átomos de C de los aminoácidos de  
 15 aproximadamente 5,01; y enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  de aproximadamente 1,09561.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la dosis inicial total de  $^{13}\text{C}$  se obtiene de una dosis de hasta 30 g del sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada de forma natural.

20 8. Un sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada de forma natural, seleccionado entre proteína total de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada, suero de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada y proteínas de la leche individuales marcadas con  $^{13}\text{C}$  aisladas que se seleccionan del grupo que consiste de lactoglobulina, lactoalbúmina, albúmina sérica y lactoferrina, preferiblemente suero de la leche marcada con  $^{13}\text{C}$  aislada, que está en forma de un polvo seco.

25 9. El sustrato de la leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada de forma natural de acuerdo con la reivindicación 8, que se obtiene de vacas que se han alimentado con maíz y caña de azúcar enriquecidos de forma natural con  $^{13}\text{C}$ .

30 10. El sustrato de la leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada de forma natural de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, que es proteína total de la leche o suero de la leche, que tiene los siguientes valores promedio ponderados estimados por molécula:

proteína total de la leche: promedio ponderado del peso molecular de los aminoácidos de aproximadamente 131,37 g/mol; promedio ponderado del número de átomos de C de los aminoácidos de aproximadamente 5,13; y enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  de aproximadamente 1,09561  
 35 suero: promedio ponderado del peso molecular de los aminoácidos de aproximadamente 130,50 g/mol; promedio ponderado del número de átomos de C de los aminoácidos de aproximadamente 5,01; y enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  de aproximadamente 1,09561.

40 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las muestras de prueba de exhalación se obtienen de un individuo humano.

45 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el individuo humano se selecciona del grupo que consiste en personas de edad avanzada, adolescentes, niños, bebés, recién nacidos e individuos con mayores demandas físicas tales como atletas, astronautas, individuos con una digestión y nutrición desequilibradas o alteradas, individuos mal nutridos o desnutridos, individuos que se alimentan de manera selectiva, individuos que sufren de incompatibilidades o intolerancias alimentarias o alergias alimentarias, individuos que sufren sarcopenia o están obligados a estar en cama, individuos con trastornos relacionados con el metabolismo muscular.

50 13. El método de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, en el que el valor [ $\dot{V}\text{CO}_2$  mmol/h/m<sup>2</sup> de superficie corporal] es de 300 mmol/h/m<sup>2</sup> de superficie corporal.

14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 11 a 13, que comprende además una o más de las etapas

- 55 - determinar la oxidación de proteínas en un individuo bajo diferentes condiciones físicas,  
 - determinar la constitución física general del individuo,  
 - determinar la actividad física promedio o el esfuerzo físico del individuo,  
 - determinar el estado de las proteínas del individuo sobre la base de los valores de oxidación de la proteína derivada,  
 60 - determinar la oxidación de proteínas y el estado de las proteínas de los bebés para determinar el estado nutricional,  
 - elegir una nutrición adecuada para el individuo en función del estado de las proteínas determinado en consideración de su constitución física general y el esfuerzo físico,  
 - dar consejos nutricionales para las diversas categorías, en particular para prevenir o contrarrestar la  
 65 desnutrición o dar consejos nutricionales para los bebés para prevenir o contrarrestar la obesidad y el desarrollo de cáncer en la vida adulta.

15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 11 a 14, en el que la dosis inicial total de  $^{13}\text{C}$  se obtiene de un sustrato de leche enriquecida con  $^{13}\text{C}$  aislada de forma natural de acuerdo con las reivindicaciones 8, 9 o 10.

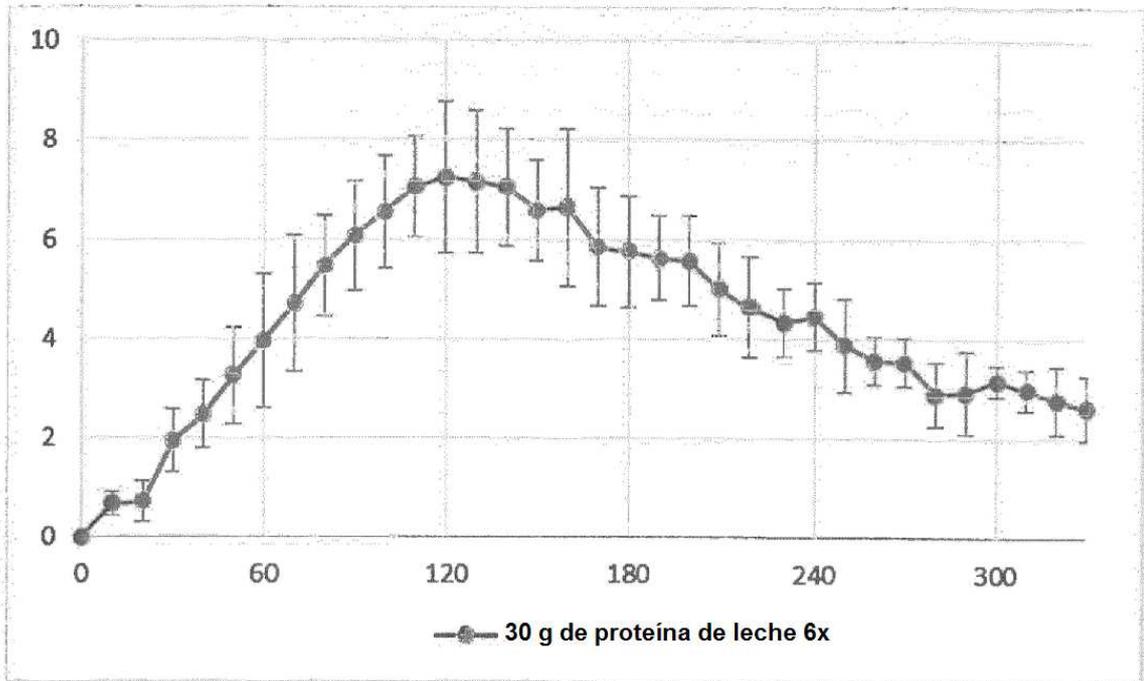


Fig. 1a

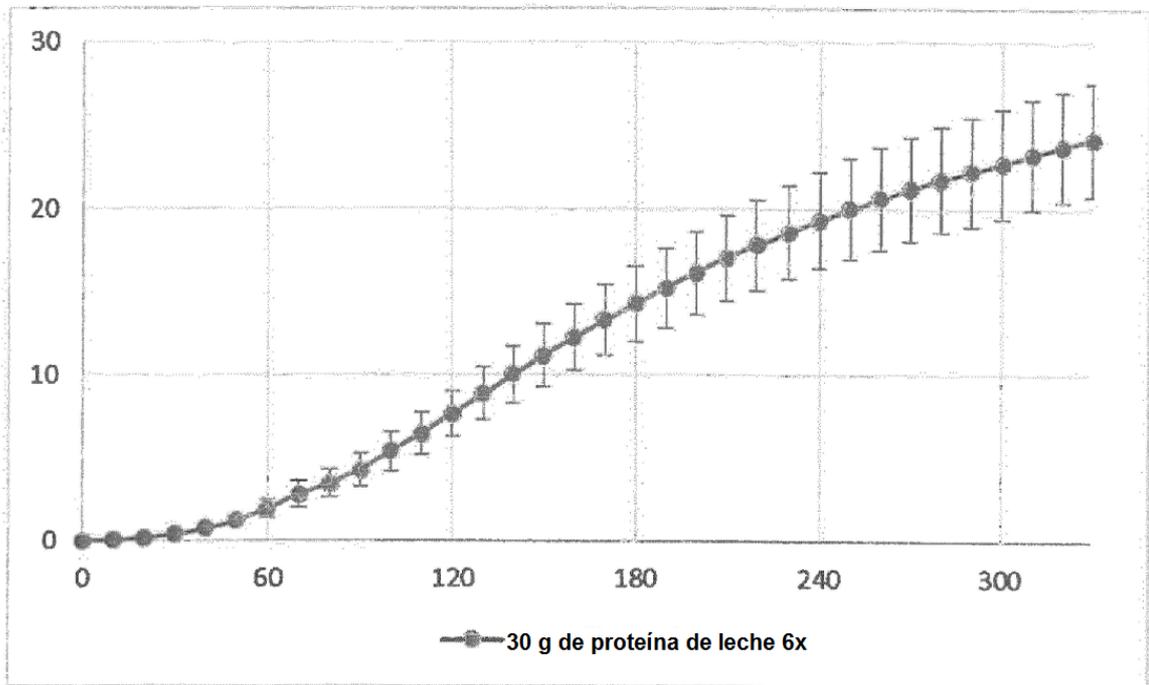


Fig. 1b

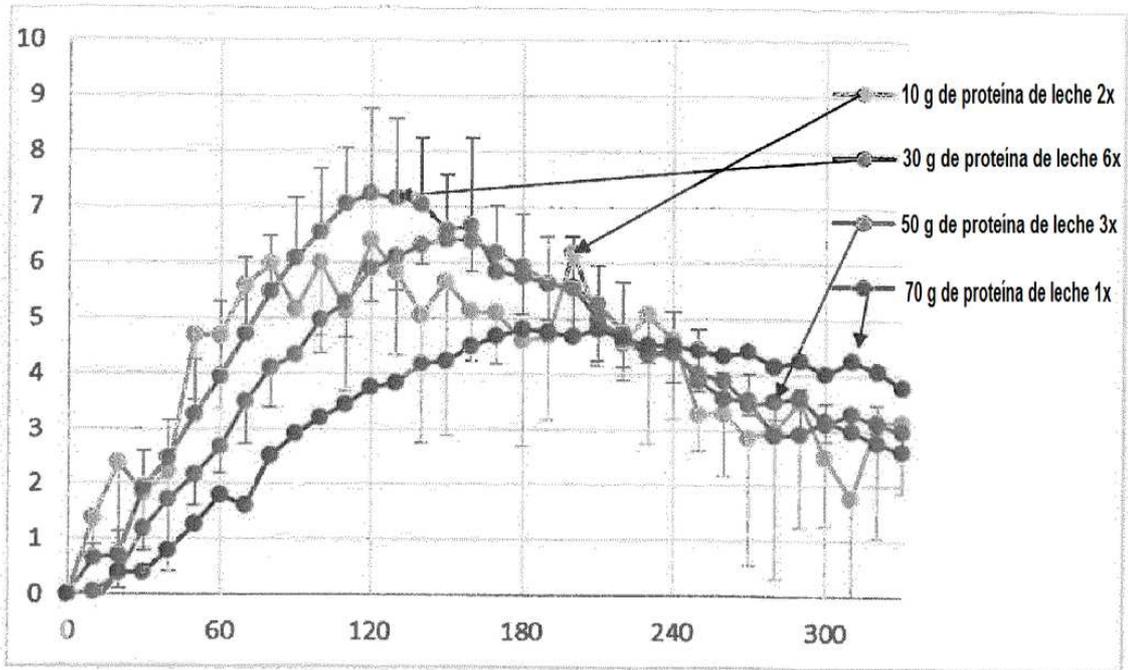


Fig. 2a

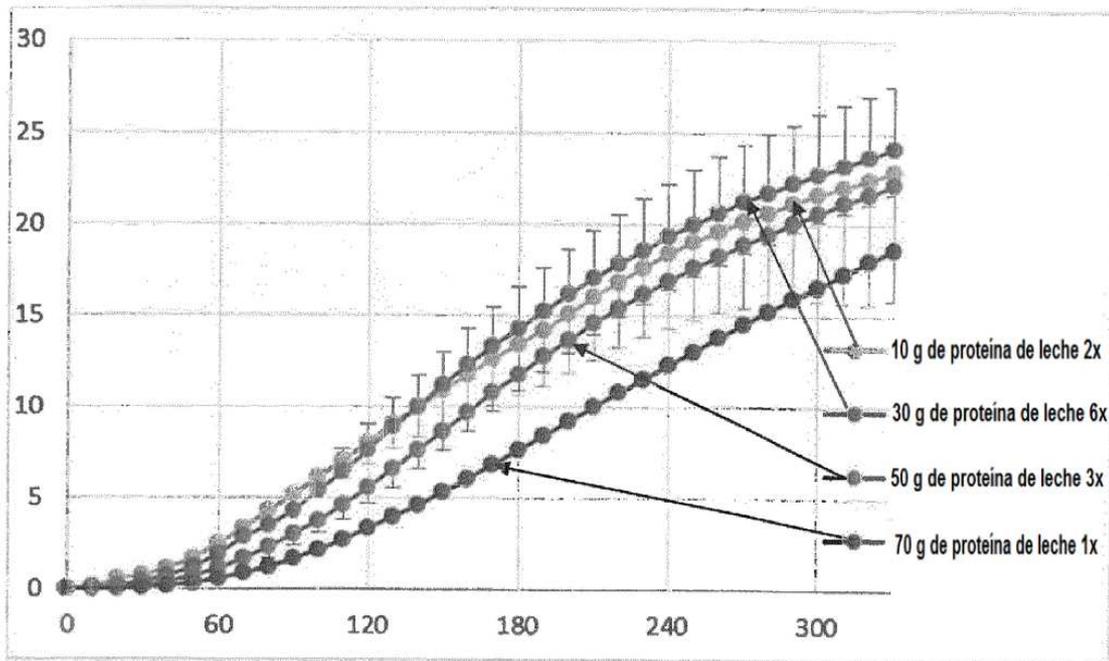


Fig. 2b

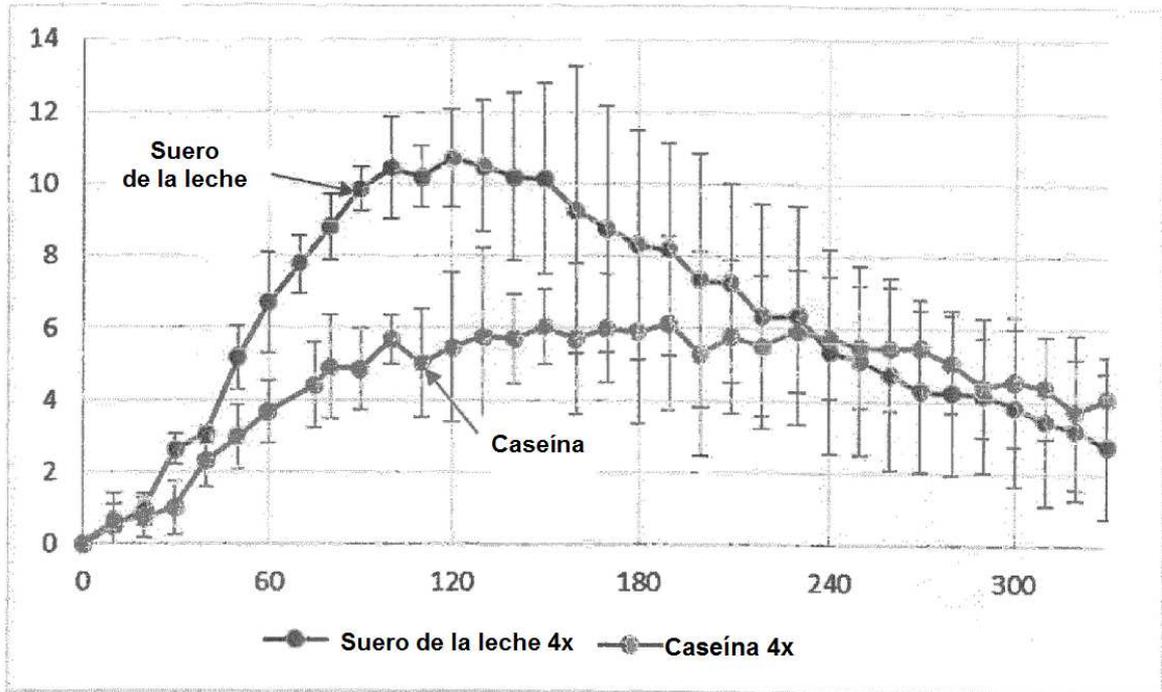


Fig. 3

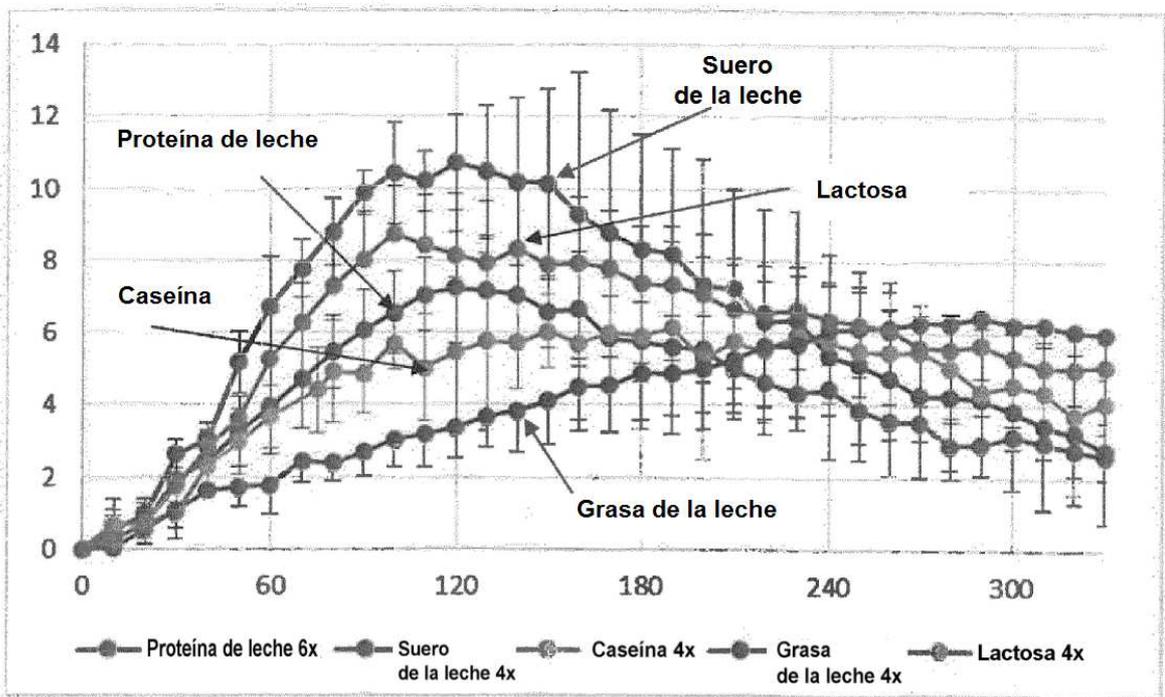


Fig. 4

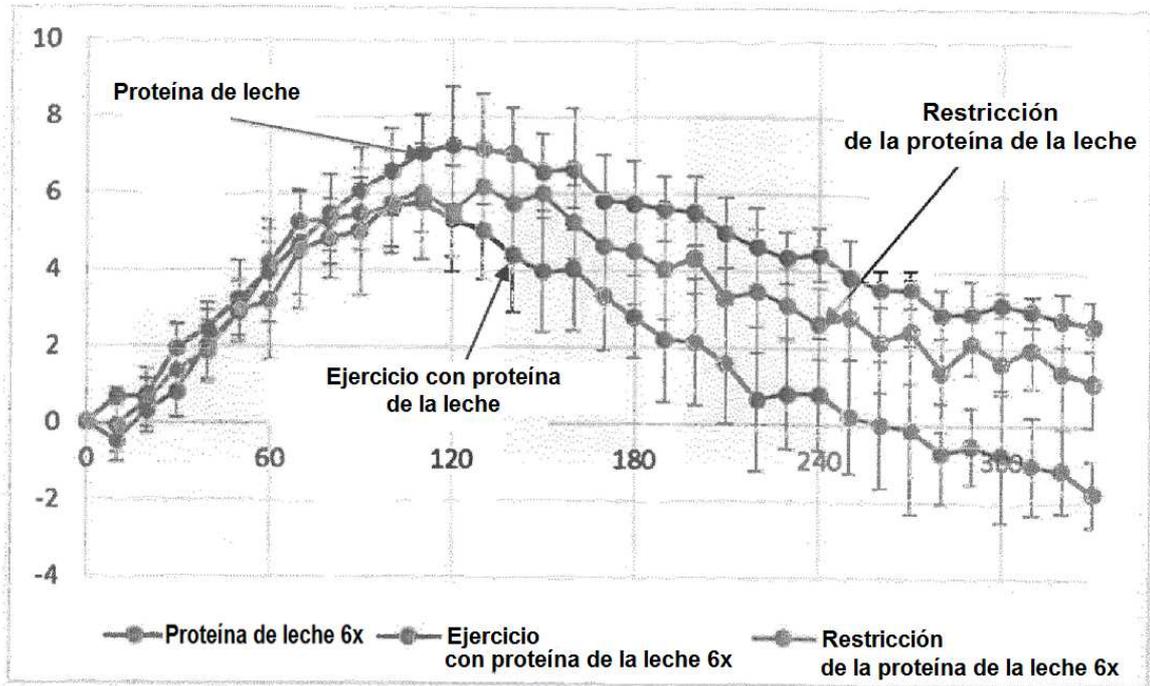


Fig. 5a

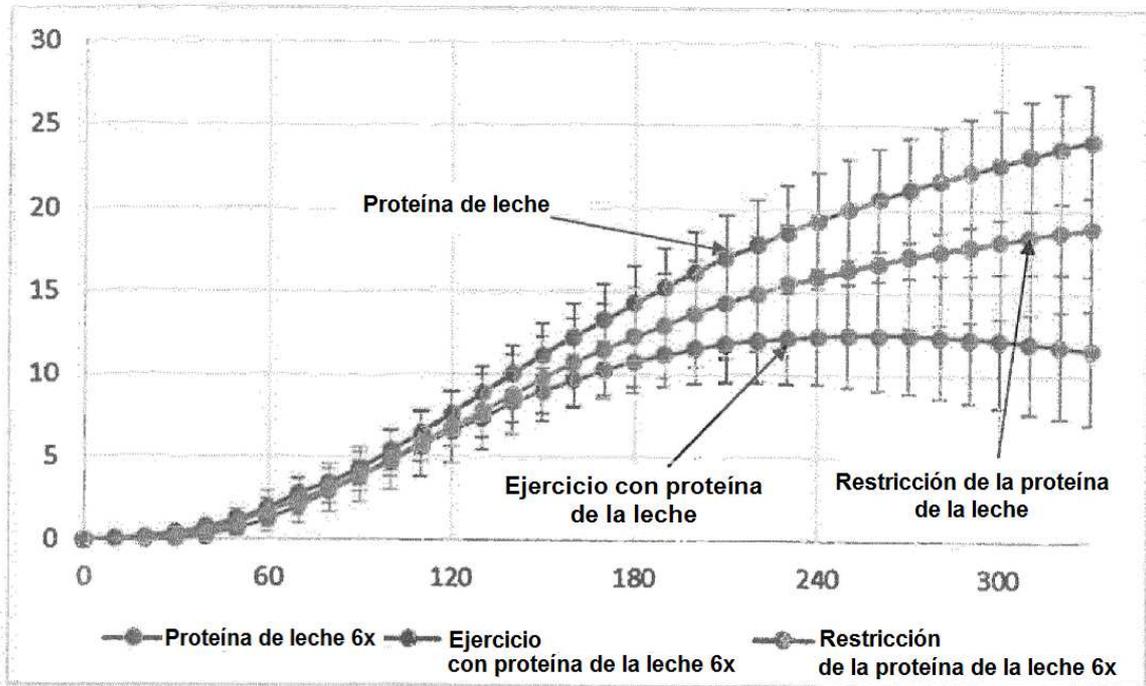


Fig. 5b

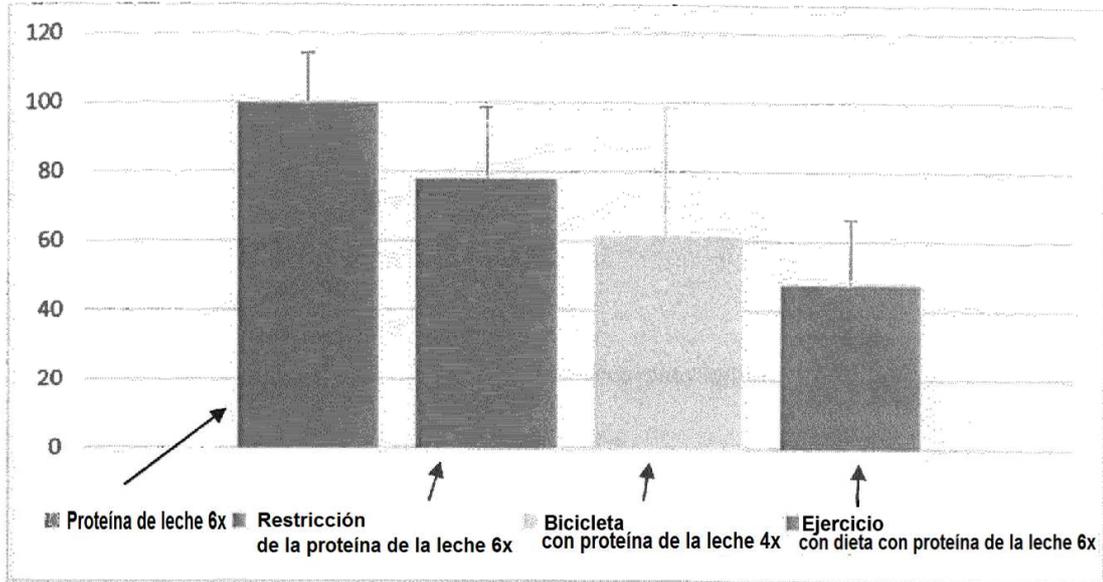


Fig. 6